

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**Gina Peres Lima dos Santos**

**MENINGITES E MENINGOENCEFALITES ASSÉPTICAS: ESTUDOS DE  
DETECÇÃO E VARIABILIDADE GENÉTICA DE AGENTES ETIOLÓGICOS  
VIRIAIS**

**Rio de Janeiro**

**2012**

**Gina Peres Lima dos Santos**

**MENINGITES E MENINGOENCEFALITES ASSÉPTICAS: ESTUDOS DE  
DETECÇÃO E VARIABILIDADE GENÉTICA DE AGENTES ETIOLÓGICOS  
VIRAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências na Área de Vigilância Sanitária.

Orientação: Dr. Edson Elias da Silva

Rio de Janeiro

2012

Catologação na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Santos, Gina Peres Lima dos

Meningites e meningoencefalites assépticas: estudos de detecção e variabilidade genética de agentes etiológicos virais / Gina Peres Lima dos Santos. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

126 f., il., tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, 2012.

Orientador: Edson Elias da Silva

1. Meningite Asséptica. 2. Meningoencefalite. 3. Variação Genética. 4. Vigilância Sanitária. I.Título.

Aseptic meningitis and meningoencephalitis: studies of detection and genetic variability of viral etiologic agents.

**MENINGITES E MENINGOENCEFALITES ASSÉPTICAS: ESTUDOS DE  
DETECÇÃO E VARIABILIDADE GENÉTICA DE AGENTES ETIOLÓGICOS  
VIRAIS**

Tese apresentada ao Curso de Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências na Área de Vigilância Sanitária.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Paola Cardarelli Leite  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Dra. Fernanda Marcicano Burlandy  
Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz

---

Dra. Silvia Maria Baeta Cavalcanti  
Universidade Federal Fluminense

---

Dr. Edson Elias da Silva - Orientador  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

A Ginelza, Adilton e Vinícius, que dedicam  
boa parte de suas vidas a mim, dedico este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

“Doutor é quem tem doutorado!” Muitos já devem ter ouvido essa máxima popular. Depois de quatro anos vivenciando o doutoramento, e de muito refletir sobre o real sentido desta frase, aprendi que doutorado não é para quem pode, como dizem por aí. Doutorado é para quem quer. Quem quer trabalhar nos fins de semana, na hora de dormir, no trânsito, na fila do elevador, na sala de espera do médico... Aprendi que o doutorado é para quem quer tentar muitas estratégias, realizar inúmeros experimentos, e repetir cada um deles. É para quem quer ter erros, acertos, sucessos, resultados positivos e negativos, literalmente... E aprendi, acima de tudo, o valor da família e dos amigos nos intervalos dessas coisas todas. Agradeço a cada um que compartilhou comigo esses momentos, pelo apoio, estímulo e companheirismo incondicionais, dia a dia, vitória a vitória, alegria a alegria, tristeza a tristeza, desafio a desafio. Agradeço por compreenderem meus momentos de ausência, que nos ensinaram o que significa estar longe, mas estar perto. Espero poder retribuir por todo carinho e dedicação.

👉 Deus, agradeço pela família a que pertenço e pela vida de saúde, paz e alegrias que vivo. Todo agradecimento aqui declarado, expressa indiretamente minha gratidão a Ti, por me conceder a dádiva de viver e conviver com pessoas tão queridas e importantes.

👉 Aos meus amados pais, Ginelza e Adilton, que me deram o melhor presente, a vida, e me ensinam até hoje o que é AMOR maiúsculo.

👉 Aos meus amados irmãos, Junior e Vivian, por todo AMOR demonstrado desde sempre.

👉 Ao meu orientador, Edson, por confiar a mim a realização deste trabalho, pela oportunidade de aprendizado num laboratório de excelência, que tanto contribui para o meu crescimento profissional, por compartilhar sua experiência nas discussões sobre os experimentos, pelo incentivo à pesquisa e pela paciência.

♥ Ao Vinícius, meu maridíssimo, que, resumindo, consegue tornar meu céu mais azul e minha vida mais colorida. Ai, Ai...

👉 Aos meus avós, padrinhos, tios, primos e afilhados do Rio, de Belo Horizonte, do Pantanal e de Macaé, pela certeza de sua companhia em todas as circunstâncias e por me proporcionarem tantas alegrias. E à família que ganhei ao casar, que me acolheu afetuosamente.

👉 Aos meus amigos, que me emocionam ao colocar na ponta do lápis e ver quantos são. Adrianas, Adrine, Alessandra, Alina, Aline Rimes, Aline Pires, Angélica, Aninha, Bira, Carol, Cátia, Chiquinho, Cláudio, Cristiane Cuca, Diego, DumDum, Elaine, Fábio, Fernanda, Geórgia, Hugão, Humberto, Jennifer, Jú, Juliana, Karina, Léo, Lilás, Márcia, Márcia Sarpa, Michele, Nicole, Paula, Paulo, Priscila, Rafaelzinho, Renata Coura, Rosane, Samir, Talitinha, Teresa, Val, Verônica. Fazer amigos é um dom. Saber ser amigo, uma virtude. Conservar os amigos, uma arte. Mas ter amigos como vocês... fala sério, é uma honra!

👉 À Eliane, pelo carinho, pela constante disponibilidade em ajudar e em ouvir, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho e pelos bolinhos e pavês.

👉 Aos amigos do LEV de todos esses anos, por toda colaboração, carinho e pela agradável convivência cotidiana. Alex, Aline Dias, Aline Silva, Amanda, Ana Carolina, Bianca, Bruna, Camila, Carina, Cátia, Cristiane, Dolcy, Douglas, Elaine, Emanuelle, Ericka, Érika, Fernanda, Fernando, Gustavo, Hugo, Isadora, Joseane, Júlia, Julianas, Junior, Krysty, Larissa, Lenise, Lidiane, Marcela, Márcia, Michele, Nathana, Patrícia, Paula, Rafael, Rafaela, Raquel, Renatas, Rita, Rosane, Sara, Silas, Stephanie, Tatiana e Viviani. Tomando emprestado o trocadilho da Eliane, sempre LEVarei o LEV em meu coração!

👉 Às crianças e aos colaboradores do Lar de Evangelização Maria Antônia, na Cidade de Deus, onde recebo muito mais do que penso dar.

👉 À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS, pela oportunidade de ingressar no Doutorado.

👉 Aos pacientes envolvidos neste trabalho, primordiais à sua realização.

\$\$ À CAPES, pelo apoio financeiro concedido.

👉 Seria injusto não agradecer, mesmo sem conhecê-los, aos inventores da internet, sem a qual seria impossível obter os inúmeros artigos científicos, entre outras facilidades proporcionadas. Só de lembrar dos dias inteiros que passei na biblioteca xerocando artigos na iniciação científica...

Consagra-te ao bem, mas não só pelo bem de ti mesmo,  
mas, acima de tudo, por amor ao próprio bem.

Emmanuel



## RESUMO

A meningite asséptica é uma síndrome infecto-contagiosa, estabelecida após inflamação das meninges. A etiologia mais comum desta síndrome é a viral, e os enterovírus são responsáveis por mais de 80% dos casos em que o agente etiológico é identificado. Outros agentes etiológicos virais envolvidos são Arbovírus (*West Nile virus*, Vírus da Encefalite Japonesa e Vírus da Encefalite de Saint Louis), vírus da caxumba, herpesvírus e adenovírus, entre outros. A primeira etapa deste estudo teve como objetivo o aprimoramento do diagnóstico dos casos de meningite asséptica e meningoencefalite com a tentativa de detecção molecular de enterovírus em 267 amostras de LCR recebidas entre 2008 e 2009, negativas para o isolamento viral em culturas de células. A extração direta do LCR seguida de síntese de cDNA e PCR foi capaz de detectar enterovírus em 59 amostras de LCR (22,1%). Estes resultados foram confirmados por sequenciamento nucleotídico parcial e demonstram que a pesquisa do genoma viral diretamente dos LCRs é apropriada para um aumento na possibilidade de detecção de enterovírus neste tipo de amostra clínica. O objetivo da segunda etapa deste estudo foi analisar o potencial papel etiológico dos flavivírus em casos de meningite asséptica e meningoencefalite. As 208 amostras negativas na etapa anterior foram utilizadas nesta etapa. Para tanto, foram desenvolvidas duas abordagens moleculares para detecção de flavivírus: *semi-Nested-PCR* e PCR convencional. Iniciadores foram desenhados para as duas técnicas. O uso desses iniciadores possibilitou a amplificação do genoma de flavivírus utilizados como controle, mostrando serem ferramentas úteis para a detecção desses vírus. Apesar disso, nenhuma amostra de LCR foi positiva para flavivírus. Diante destes resultados, da possibilidade da circulação silenciosa de WNV ou de sua entrada iminente no país, é evidenciada a necessidade de estudos adicionais sobre este vírus e outros flavivírus nestes casos. Na terceira etapa deste estudo, foi realizada a análise da variabilidade genética de echovírus 30 envolvidos em surtos e casos esporádicos de meningite asséptica entre 1998 e 2008, através da análise filogenética do gene completo (876 nt) da VP1 de 48 E30 isolados. Além da comparação das amostras entre si, foram feitas comparações destas com a VP1 da cepa protótipo Bastianni e também com outras cepas isoladas em diversos países. Durante o período do estudo, E30 foi o principal enterovírus envolvido nos casos de meningite asséptica e meningoencefalite no Brasil (58,6% dos 302 enterovírus isolados), tendo sido o agente etiológico de seis surtos. As sequências de VP1 de E30 segregaram em três Grupos distintos e sete subgrupos, cujos agrupamentos estavam fortemente associados ao ano de isolamento. A divergência de sequências nucleotídicas entre os E30 isolados variou de 0,2-13,8%. Não foi definido um ancestral comum direto para este conjunto de isolados de E30. O isolado 39-SC-

BA-07 estava geneticamente relacionado com cepas de E30 isoladas no Pará (3,2-4,6% de divergência) e pode ser originário de uma destas cepas. Os isolados do Grupo I estavam geneticamente relacionados com uma sequência de E30 isolada em 1997 nos Estados Unidos (2,4-5,7%), sendo provável que eles possuam um ancestral comum. Dois E30 isolados na Argentina em 2007 mostraram estreita relação com os isolados do Grupo III (5,8-6,0%), podendo ter sido originados a partir de um dos isolados deste Grupo III.

Palavras-Chave: Meningite asséptica. Enterovírus. Flavivírus. Análise Filogenética.

## ABSTRACT

Aseptic meningitis is an infectious disease, established after infection of the meninges. The most common etiology of this syndrome is viral, and enteroviruses are responsible for more than 80% of cases in which the etiologic agent is identified. Other viral etiologic agents involved are Arboviruses such as West Nile Virus, Japanese Encephalitis Virus and St. Louis Encephalitis Virus. The first step of this study aimed at expanding the possibility of diagnosing cases of aseptic meningitis and meningoencephalitis in an attempt to molecular detection of enteroviruses in 267 CSF samples received between 2008 and 2009, negative for virus isolation in cell cultures. The direct extraction of CSF followed by cDNA synthesis and PCR was able to detect enteroviruses in 59 CSF samples (22.1%). These results were confirmed by partial nucleotide sequencing and shows that searching of the viral genome directly from CSF is appropriate for an increase in the chance of enterovirus detection in CSF samples. The goal of the second stage of this study was to analyze the potential etiologic role of flavivirus in cases of aseptic meningitis and meningoencephalitis. The 208 negative samples in the previous step were used in this part. To this end, two approaches have been developed for molecular detection of flaviviruses: semi-nested-PCR and conventional PCR. Primers were designed for both techniques. The use of these primers allowed the amplification of the genome of flaviviruses tested, shown to be useful tools for the detection of these viruses. Nevertheless, no CSF sample was positive for flavivirus. Given these results, the possibility of silent circulation of WNV or its imminent entry in the country, it is evident the need of additional studies on this virus and other flaviviruses in these cases. In the third stage of the study, was conducted the analysis of the genetic variability of echovirus 30 involved in outbreaks and sporadic cases of aseptic meningitis between 1998 and 2008, through phylogenetic analysis of the complete gene (876 nt) of the VP1 of 48 E30 isolates. Besides the comparison of samples among themselves, comparisons were made with them and the VP1 of prototype strain Bastianni and also with other strains isolated in various countries. During the study period, E30 was the main enterovirus involved in aseptic meningitis and meningoencephalitis cases in Brazil (58.6% of 302 isolated enteroviruses), being the etiological agent of six outbreaks. The VP1 sequences of E30 segregated into three distinct groups and seven subgroups, whose grouping was strongly associated with year of isolation. The divergence between the nucleotide sequences of E30 isolates ranged from 0.2 to 13.8%. It was not defined a common ancestor directly to this set of isolated E30. The isolate 39-SC-BA-07 was genetically related with strains of E30 isolated in Pará (3.2 to 4.6% of divergence)

and might be originated from one of these strains. Group I isolates were genetically related to a sequence of E30 isolated in the United States in 1997 (2.4 to 5.7%), and they likely have a common ancestor. Two E30 isolated in Argentina in 2007 showed a close relationship with the isolates of Group III (5.8 to 6.0%) and may have been originated from one of the Group III isolates.

**Keywords:** Aseptic Meningitis. Enteroviruses. Flavivirus. Phylogenetic Analysis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 01</b>	<b>Esquemas do Capsídeo de um Enterovírus com as Proteínas VP1, VP2, VP3 e VP4</b>	<b>25</b>
<b>FIGURA 02</b>	<b>Organização do Genoma dos Enterovírus</b>	<b>25</b>
<b>FIGURA 03</b>	<b>Ciclo Replicativo dos Enterovírus</b>	<b>28</b>
<b>FIGURA 04</b>	<b>Esquema do vírion e do genoma dos Flavivírus</b>	<b>33</b>
<b>FIGURA 05</b>	<b>Ciclo Replicativo dos Flavivírus</b>	<b>35</b>
<b>FIGURA 06</b>	<b>Fluxograma Simplificado da Metodologia Envolvida na Detecção de Agentes Etiológicos Virais</b>	<b>50</b>
<b>FIGURA 07</b>	<b>Local de Hibridização dos Iniciadores EVR e EVF no Genoma dos Enterovírus</b>	<b>51</b>
<b>FIGURA 08</b>	<b>Local de Hibridização dos Iniciadores F1, F2 e R1 no Genoma dos Flavivírus</b>	<b>54</b>
<b>FIGURA 09</b>	<b>Local de Hibridização dos Iniciadores FlaPCRF e FlaPCRR no Genoma dos Flavivírus</b>	<b>56</b>
<b>FIGURA 10</b>	<b>Fluxograma Simplificado da Metodologia Envolvida no Estudo da Variabilidade Genética de Echovírus 30</b>	<b>59</b>
<b>FIGURA 11</b>	<b>Local de Hibridização dos Iniciadores 011 (R) e 008 (F) no Genoma dos Enterovírus</b>	<b>61</b>
<b>FIGURA 12</b>	<b>Perfil Eletroforético dos Produtos Amplificados, por PCR, para a Detecção Molecular de Enterovírus</b>	<b>65</b>
<b>FIGURA 13</b>	<b>Perfil Eletroforético dos Produtos Amplificados na Otimização da Detecção Molecular de Flavivírus por <i>Semi-Nested-PCR</i></b>	<b>67</b>
<b>FIGURA 14</b>	<b>Perfil Eletroforético dos Produtos Amplificados na <i>Semi-Nested-PCR</i></b>	<b>67</b>
<b>FIGURA 15</b>	<b>Perfil Eletroforético dos Produtos Amplificados na PCR Convencional</b>	<b>68</b>
<b>FIGURA 16</b>	<b>Perfil Eletroforético dos Produtos Amplificados na PCR para E30</b>	<b>74</b>
<b>FIGURA 17</b>	<b>Perfil Eletroforético da Quantificação da Concentração de DNA dos Produtos Amplificados na PCR para E30 (960 pb)</b>	<b>74</b>
<b>FIGURA 18</b>	<b>Análise Filogenética das Sequências do Gene VP1 (876 nt) de 48 Echovírus 30 Isolados no Brasil (1998-2008)</b>	<b>76</b>
<b>FIGURA 19</b>	<b>Análise Filogenética das Sequências Parciais do Gene VP1 (349 nt) dos 48 Echovírus 30 Isolados no Brasil e de Cinco Sequências do Estado do Pará</b>	<b>79</b>
<b>FIGURA 20</b>	<b>Análise Filogenética das sequências do Gene VP1 (876 nt) de representantes dos Grupos I, II e III e de 46 isolados de outros países</b>	<b>81</b>
<b>FIGURA 21</b>	<b>Análise Filogenética das Sequências Parciais do Gene VP1 (420 nt) de 48 Echovírus 30 Isolados no Brasil e de oito Sequências da Argentina</b>	<b>82</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 01</b>	<b>Características do LCR em Indivíduos Sadios e em Casos de Meningite Purulenta e Asséptica.</b>	<b>20</b>
<b>TABELA 02</b>	<b>Classificação dos Enterovírus Humanos Baseada na Análise do Genoma Viral</b>	<b>23</b>
<b>TABELA 03</b>	<b>Características Epidemiológicas dos Flavivírus já Identificados no Brasil</b>	<b>31</b>
<b>TABELA 04</b>	<b>Iniciadores Usados na <i>Semi-Nested</i> PCR e na PCR Convencional para Detecção de Flavivírus</b>	<b>53</b>
<b>TABELA 05</b>	<b>Aspectos Epidemiológicos dos Pacientes Incluídos no Estudo</b>	<b>70</b>
<b>TABELA 06</b>	<b>Informações dos Isolados de Echovírus 30 Analisados</b>	<b>71</b>
<b>TABELA 07</b>	<b>Características Epidemiológicas e Genéticas dos seis surtos de meningite por Echovírus 30 ocorridos no Brasil - 1998 a 2008</b>	<b>73</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3' NC	Região 3' Não Codificante
5' NC	Região 5' Não Codificante
aa	Aminoácido
bp	<i>Base Pairs</i>
BVSV	Bussuquara Vírus
Cap 5'	7-Metil Guanosina na Extremidade 5' do Genoma
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	DNA Complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CVA	Coxsackievírus A
CVB	Coxsackievírus B
CPCV	Cacipacoré Vírus
Da	Dalton
DENV-1a 4	Dengue Vírus 1 a 4
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNTP`s	Deoxinucleotídeos Tri-Fosfato
ddNTP`s	Dideoxinucleotídeos Tri-Fosfato
E30	echovírus 30
Echo	echovírus
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EV	Enterovírus
EVNP	Enterovírus não-polio
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gravidade
HEV	Enterovírus Humanos
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HRV	Rhinovírus Humano
HSV	Herpes simplex vírus
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
ILHV	Ilhéus Vírus
IGUV	Iguape Vírus
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
JEC	Complexo da Encefalite Japonesa
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa
Kb	Kilobases
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LEV	Laboratório de Enterovírus
min	Minuto
MS	Ministério da Saúde
NBR	Norma Brasileira
nm	Nanômetro
NM	Norma Mercosul
nt	Nucleotídeo
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de Bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)

PNI	Programa Nacional de Imunizações
ppm	Partes por milhão
PrM	Proteína pré Membrana
PRNT	Teste de Neutralização por Redução em Placa
PV	Poliovírus
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
ROCV	Rocio Vírus
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	<i>Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction</i>
seg	Segundo
SC	<i>Sporadic Case</i> (Caso Esporádico)
SLEV	Vírus da Encefalite de St. Louis
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TBEC	Complexo dos Vírus da encefalite transmitida por carrapato
UV	Luz Ultravioleta
VPg	<i>Virion Protein genome</i>
WNV	<i>West Nile virus</i>
YFV	Vírus da Febre Amarela
WHO	<i>World Health Organization</i>



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
1.1 ASPECTOS GERAIS DA MENINGITE ASSÉPTICA	19
1.2 ETIOLOGIA DA MENINGITE ASSÉPTICA	20
1.3 ENTEROVÍRUS	22
1.3.1 Classificação taxonômica dos enterovírus	22
1.3.2 Composição e características físico-químicas dos enterovírus	23
1.3.3 Ciclo replicativo dos enterovírus	26
1.3.4 Variabilidade genética de echovírus 30	28
1.4 FLAVIVÍRUS	29
1.4.1 Classificação taxonômica dos flavivírus	29
1.4.2 Composição e características físico-químicas dos flavivírus	31
1.4.3 Ciclo replicativo dos flavivírus	34
1.5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA MENINGITE ASSÉPTICA	35
1.6 DIAGNÓSTICO DA MENINGITE ASSÉPTICA	36
1.7 TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA MENINGITE ASSÉPTICA	38
1.8 PATOGENIA DA MENINGITE ASSÉPTICA	39
1.9 EPIDEMIOLOGIA DA MENINGITE ASSÉPTICA	40
1.10 AÇÕES DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE	41
1.11 RELEVÂNCIA DA VIGILÂNCIA DA MENINGITE ASSÉPTICA	44
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>48</b>
3.1 DETECÇÃO DE AGENTES ETIOLÓGICOS VIRAIS	48
3.1.1 Amostras clínicas	48
3.1.1.1 Critérios para inclusão e exclusão das amostras de LCR	48
3.1.2 Extração de RNA viral	49
3.1.3 Síntese do cDNA	49
3.1.4 Detecção molecular de enterovírus	51
3.1.4.1 <i>Confirmação da detecção de enterovírus por sequenciamento nucleotídico</i>	52
3.1.5 Detecção molecular de flavivírus	53
3.1.5.1 <i>Desenho dos iniciadores e otimização da Semi-Nested-PCR para detecção de flavivírus</i>	53
3.1.5.2 <i>Semi-Nested-PCR para detecção de flavivírus</i>	54

3.1.5.3 <i>Desenho dos iniciadores e otimização da PCR convencional para detecção de flavivírus</i>	55
3.1.5.4 <i>PCR convencional para detecção de flavivírus</i>	56
3.1.5.5 <i>Confirmação da detecção de flavivírus por sequenciamento nucleotídico</i>	57
3.1.6 <i>Análise do perfil dos pacientes</i>	57
3.2 ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ECHOVÍRUS 30	57
3.2.1 <i>Amostras clínicas</i>	57
3.2.2 <i>Incidência de E30</i>	58
3.2.3 <i>Sequenciamento nucleotídico do gene completo da VP1 de E30</i>	60
3.2.3.1 <i>Extração de RNA viral</i>	60
3.2.3.2 <i>Síntese do cDNA</i>	60
3.2.3.3 <i>PCR para E30</i>	60
3.2.3.4 <i>Eluição do DNA</i>	61
3.2.3.5 <i>Quantificação da concentração de DNA</i>	61
3.2.3.6 <i>Reações cíclicas de sequenciamento (cycle-sequencing)</i>	62
3.2.3.7 <i>Purificação dos produtos de cycle-sequencing</i>	62
3.2.3.8 <i>Análise das sequências (confirmação da identidade viral)</i>	63
3.2.4 <i>Análise filogenética da VP1 de E30</i>	63
3.3 <i>Aspectos éticos</i>	64
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>65</b>
4.1 DETECÇÃO DE AGENTES ETIOLÓGICOS VIRAIS	65
4.1.1 <i>Detecção molecular de enterovírus</i>	65
4.1.1.1 <i>Confirmação da detecção de enterovírus por sequenciamento nucleotídico</i>	66
4.1.2 <i>Detecção molecular de flavivírus</i>	66
4.1.2.1 <i>Semi-Nested-PCR</i>	66
4.1.2.2 <i>PCR convencional</i>	68
4.1.2.3 <i>Confirmação da detecção de flavivírus por sequenciamento nucleotídico</i>	69
4.1.3 <i>Análise do perfil dos pacientes</i>	69
4.2 ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ECHOVÍRUS 30	70
4.2.1 <i>Incidência de E30</i>	70
4.2.2 <i>Sequenciamento nucleotídico do gene completo da VP1 de E30</i>	74
4.2.3 <i>Análise filogenética do gene VP1 de E30</i>	75
4.2.3.1 <i>Comparação com outros E30 isolados no Brasil</i>	77
4.2.3.2 <i>Comparação com E30 isolados em outros países</i>	80
4.2.3.3 <i>Análise de similaridade de aminoácidos da VP1 de E30</i>	80

<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>83</b>
5.1 DETECÇÃO MOLECULAR DE ENTEROVÍRUS EM AMOSTRAS NEGATIVAS QUANTO AO ISOLAMENTO VIRAL EM CULTURAS DE CÉLULAS	<b>83</b>
5.2 DETECÇÃO MOLECULAR DE FLAVIVÍRUS EM CASOS DE MENINGITE ASSÉPTICA E MENINGOENCEFALITE	<b>86</b>
5.3 ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ECHOVÍRUS 30	<b>90</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>93</b>
<b>7 PERSPECTIVAS</b>	<b>94</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO A</b> PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO IPEC/FIOCRUZ	<b>106</b>
<b>ANEXO B</b> ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO NO <i>JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY</i>	<b>108</b>
<b>ANEXO C</b> ARTIGO CIENTÍFICO A SER SUBMETIDO NO PERIÓDICO MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ	<b>116</b>
<b>ANEXO D</b> – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO AO PERIÓDICO <i>VIRUS REVIEWS AND RESEARCH</i>	<b>122</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS GERAIS DA MENINGITE ASSÉPTICA

Meningite Asséptica é o nome utilizado para identificar um conjunto de manifestações clínicas estabelecidas após inflamação das meninges. Esta denominação é comumente utilizada devido às características do líquido cefalorraquidiano (LCR), ou líquido, nessa síndrome. Ao contrário das meningites purulentas ou bacterianas, onde o LCR apresenta-se geralmente turvo, nas meningites assépticas este permanece límpido, dando a falsa impressão de que está estéril, como num indivíduo sadio (KUMAR, 2005).

A celularidade (contagem de células) encontrada no LCR de um indivíduo sadio deve ser baixa, de até 4 células / mm<sup>3</sup> (MOURA et al, 2002). Em meningites assépticas a celularidade é inferior a 500 células / mm<sup>3</sup>, enquanto que nas meningites purulentas esse número normalmente é maior que 1000 células / mm<sup>3</sup> (CONNOLLY; HAMMER, 1990; NEGRINI; KELLEHER; WALD, 2000; NIGROVIC; MALLEY; KUPPERMANN, 2009).

Algumas características do LCR em indivíduos sadios e em pacientes com meningite purulenta e meningite asséptica estão descritas na **TABELA 01**.

Quando a infecção se propaga das meninges para as células do parênquima cerebral, ocorre a meningoencefalite. Emprega-se o termo encefalomielite quando há envolvimento da medula espinhal e do cérebro (PROBER, 2000).

A meningite asséptica é uma síndrome infecto-contagiosa e os modos de transmissão dependem do agente etiológico envolvido. A contaminação fecal-oral é uma das principais formas de transmissão, mas evidências mostram que aerossóis de secreções respiratórias de indivíduos infectados podem também ser fontes de transmissão dessa síndrome (PALLANSCH; ROOS, 2001).

O modo de transmissão para os Arbovírus envolvidos em quadros de meningite asséptica é através da picada de fêmeas de mosquitos hematófagos infectadas por estes vírus (IWAMOTO et al, 2003; NAVARRO et al, 2004). Os principais vetores do *West Nile virus* (WNV), também chamado vírus do Nilo Ocidental, são culicídeos das espécies *Culex pipiens*, *C. restuans* e *C. salinarius*, principalmente (NASCI et al, 2001).

**TABELA 01 - Características do LCR em Indivíduos Sadios e em Casos de Meningite Purulenta e Asséptica.**

<b>Parâmetros de Análise</b>	<b>LCR Normal</b>	<b>Meningite Purulenta</b>	<b>Meningite Asséptica</b>
<b>Aspecto</b>	Límpido	Turvo	Límpido
<b>Cor</b>	Incolor	Branca-Leitosa ou Xantocrômica	Incolor
<b>Coágulo</b>	Ausente	Presente ou Ausente	Ausente
<b>Cloretos (mg %)</b>	680 a 750*	Reduzidos	680 a 750*
<b>Glicose (mg %)</b>	50 a 80*	Reduzida	50 a 80*
<b>Proteínas Totais (mg %)</b>	13 a 25*	Elevadas	Levemente Elevadas
<b>Gamaglobulinas (mg %)</b>	2 a 5	Elevadas	Elevadas ou Normais
<b>Leucócitos</b>	0 a 4 / mm <sup>3</sup>	500 a Milhares / mm <sup>3</sup>	5 a 500 / mm <sup>3</sup>
<b>Microscopia Óptica</b>	-	Visualização (ou Não) de Células Bacterianas	Nenhuma Visualização
<b>Crescimento em Cultura</b>	-	Presença em meios de cultivo bacterianos	Presença em cultura celular (etiologia viral)

\*- Para Recém-Nascidos: Cloretos - 702 a 749; Glicose - 42 a 78; Proteínas - 33 a 119; Leucócitos - 0 a 15  
 Fonte : MOURA et al, 2002 ; NEGRINI; KELLEHER; WALD, 2000.

## 1.2 ETIOLOGIA DA MENINGITE ASSÉPTICA

A etiologia mais comum da meningite asséptica é a viral, onde os enterovírus são predominantes em diversos países. Eles são responsáveis por mais de 80% dos casos de meningite viral em que o agente etiológico é identificado (PALLANSCH; ROOS, 2001). Tem sido observada uma contínua circulação de diversos sorotipos de enterovírus envolvidos em surtos e casos esporádicos de meningite viral no mundo, tais como echovírus 4, 6, 13, 18 e 30 (CHOI et al, 2010; GRENÓN et al, 2008; HAYASHI et al, 2009; JULIÁ et al, 2009; KMETZSCH et al, 2006; MIRAND et al, 2008; PAPA et al, 2009; PINTO JUNIOR et al, 2009) e coxsackievírus B5 (SILVA et al, 2002; TAVAKOLI et al, 2008; THOELLEN et al, 2003).

Entre eles, echovírus 30 (E30) é um dos agentes predominantes em muitos países (BAILLY et al, 2002; CABRERIZO et al, 2008; CASTRO et al, 2009; DOS SANTOS et al,

2006; HAYASHI et al, 2009; OBERSTE et al, 1999; SAVOLAINEN; HOVI; MULDER, 2001; TRALLERO et al, 2000).

Alguns arbovírus são descritos como agentes etiológicos de meningite asséptica e meningoencefalite, como WNV, Vírus da Encefalite Japonesa (JEV) e Vírus da Encefalite de St. Louis (SLEV) (BARZON et al 2009; BURKE; MONATH 2001; CHADWICK, 2005; GOULD; SOLOMON, 2008; GYURE 2009; KOPEL et al, 2011).

Nas américas são descritos diversos casos e epidemias por SLEV (JONES et al, 2002; SPINSANTI et al, 2008) e WNV (JULIAN et al, 2003; KRAMER; LI; SHI, 2007; NASH et al, 2001). No Brasil, Romano-Lieber e Iversson (2000) demonstraram a presença de anticorpos neutralizantes para SLEV, e Rocco e colaboradores (2005), isolaram SLEV de um caso clínico semelhante a um caso de dengue. Surtos de meningoencefalite por SLEV também já foram descritos no Brasil (MORAES BRONZONI et al, 2005)

Outros vírus também envolvidos em casos de meningite asséptica e meningoencefalite são: Herpes Simplex vírus (HSV-1 e 2), Varicella-Zoster vírus, Vírus da Caxumba, Adenovírus e Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (BRASIL et al, 2005; FRANZEN-ROHL et al, 2008; HABIB et al, 2009; IHEKWABA; KUDESIA; MCKENDRICK, 2008; LANDRY; GREENWOLD; VIKRAM, 2009; LEE; DAVIES, 2007; NAVARRO et al, 2004; NOWAK; BOEHMER; FUCHS, 2003).

As meningites e meningoencefalites assépticas causadas por herpesvírus e por alguns flavivírus são as mais importantes em termos de gravidade e mortalidade (CHADWICK, 2005).

A meningite asséptica pode ainda, ser de etiologia bacteriana como consequência de um tratamento realizado parcialmente e *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* tipo b estão comumente envolvidos (HARRISON, 2006; LEIMKUGEL et al, 2005). O LCR, nestes casos, permanece límpido, levando a uma confusão no diagnóstico inicial (BRASIL, 2009). Na meningite tuberculosa, na causada por *Leptospira* spp e nas riquetsioses, o LCR também fica límpido (SILVA et al, 2002; NEGRINI; KELLEHER; WALD, 2000).

São descritas também causas pós-infecciosas como meningite após rubéola, após caxumba, após vacinação contra a raiva, influenza e febre amarela. Além destas, é possível, ainda, existirem causas não infecciosas, como o uso de alguns medicamentos, como alopurinol e carbamazepina; doenças sistêmicas, como lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide; leucemias, tumores cerebrais e inflamações de estruturas adjacentes, como o abscesso epidural ou cerebral (KUMAR, 2005; LEE; DAVIES, 2007).

A etiologia da meningite deve ser especificada porque exige monitoramentos e tratamentos diferenciados, dependendo do agente envolvido (KUMAR, 2005).

### 1.3 ENTEROVÍRUS

#### 1.3.1 Classificação Taxonômica dos Enterovírus

Os enterovírus pertencem à família *Picornaviridae* (*pico* = pequeno; *rna* = ácido ribonucléico). Esses vírus foram inicialmente identificados e classificados com base nas suas características morfológicas e antigenicidade verificada em testes de neutralização com antisoros específicos para esses vírus. Segundo a classificação taxonômica atual dos vírus, oficializada pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), atualmente são conhecidos 12 gêneros (ou grupos) desta família: *Enterovirus* (102 sorotipos), que agora inclui o antigo gênero *Rhinovirus* (103 sorotipos), *Cardiovirus* (3 sorotipos), *Aphthovirus* (8 sorotipos), *Hepatovirus* (2 sorotipos), *ParEchovirus* (2 sorotipos), *Teschovirus* (10 sorotipos), *Kobuvirus* (1 sorotipo), *Erbovirus* (1 sorotipo) e também os novos gêneros descritos: *Sapelovirus* (5 sorotipos), *Senecavirus* (1 sorotipo), *Tremovirus* (1 sorotipo) e *Avihepatovirus* (1 sorotipo) (KNOWLES et al, 2011).

Os enterovírus humanos são representados por diversos sorotipos, sendo eles: poliovírus (apresentando 3 sorotipos), coxsackievírus A (23 sorotipos), coxsackievírus B (6 sorotipos), echovírus (28 sorotipos), rhinovírus (103 sorotipos) e enterovírus sorotipos 68-116 (KNOWLES et al, 2011; OBERSTE et al, 2001, 2004, 2005; PALLANSCH; ROOS, 2001).

Outra classificação para os enterovírus, com base em dados biológicos e em resultados de análises moleculares do genoma completo viral, agrupa os enterovírus humanos (HEV) em sete espécies, como pode ser observado na **TABELA 02** (BROWN et al, 2003; OBERSTE et al, 2001, 2004, 2005; PALLANSCH; ROOS, 2001).

**TABELA 02 – Classificação dos Enterovírus Humanos Baseada na Análise do Genoma Viral.**

Espécies dos Enterovírus						
Enterovírus humanos A (HEV-A)	Enterovírus humanos B (HEV-B)	Enterovírus humanos C (HEV-C)	Enterovírus humanos D (HEV-D)	Rhinovírus humanos A (HRV-A)	Rhinovírus humanos B (HRV-B)	Rhinovírus humanos C (HRV-C)
CVA2-A8	CVB1-B6	PV1	EV68	HRV1-2	HRV3-6	HRVA2 OU HRVC
CVA10	CVA9	PV2	EV70	HRV7-13	HRV14	
CVA12	E1-7	PV3	EV94	HRV15-16	HRV17	
CVA14	E9	CVA1	EV111	HRV18-25	HRV26-27	
CVA16	E11-21	CVA11		HRV28-34	HRV35	
EV71	E24-27	CVA13		HRV36	HRV37	
EV76	E29-33	CVA15		HRV38-41	HRV42	
EV89	EV69	CVA17-22		HRV43-47	HRV48	
EV90	EV73	CVA24		HRV49-51	HRV52	
EV91	EV74	EV95-96		HRV53-68	HRV69-70	
EV114	EV75	EV99		HRV71	HRV72	
	EV77	EV102		HRV73-78	HRV79	
	EV78-88	EV104		HRV80-82	HRV83-84	
	EV93	EV105		HRV 85	HRV86	
	EV97-98	EV109		HRV88-90	HRV91-93	
	EV100-101	EV113		HRV9496	HRV97	
	EV106-107	EV116		HRV98	HRV99	
	EV110			HRV100		

Legenda: CVA – coxsackievírus A; CVB – coxsackievírus B; E – echovírus; EV – enterovírus; PV – poliovírus; HRV - rhinovírus.

Fonte: Adaptado de KNOWLES et al, 2011.

### 1.3.2 Composição e características físico-químicas dos enterovírus

Os enterovírus são vírus esféricos, não envelopados, medindo cerca de 27 nm de diâmetro. Sua estrutura genômica consiste em um RNA de fita simples de polaridade positiva, com aproximadamente 7,5 Kb, e peso molecular de cerca de  $2,6 \times 10^6$  Da. São poliadenilados na extremidade 3' (de 40 a 100 nucleotídeos), e apresentam uma proteína, a VPg (*Virion Protein genome*), ligada covalentemente à extremidade 5' do RNA viral. Esta região terminal (5'NC) não é codificante e é altamente conservada, sendo útil nas identificações moleculares do gênero enterovírus (RACANIELLO, 2001).

O RNA desses vírus contém uma única fase de leitura codificando uma poliproteína, que é clivada na tradução do genoma viral. As clivagens são realizadas por proteínas



codificadas pelo próprio vírus, gerando diversos produtos protéicos com diferentes funções, como as proteínas do capsídeo, proteinases e RNA polimerase. Seu capsídeo tem simetria icosaédrica, é composto de 60 subunidades idênticas, os protômeros. Estes são constituídos de quatro polipeptídeos ou proteínas, denominadas VP1, VP2, VP3 e VP4, que são produtos de reações proteolíticas do segmento P1. As proteínas VP1, VP2 e VP3 estão expostas na superfície do vírion, enquanto que VP4 fica internalizada e associada ao RNA viral. Dessa forma, os epítomos responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes estão localizados, principalmente, em VP1, que é a proteína mais exposta, e também em VP2 e VP3 (RACANIELLO, 2001).

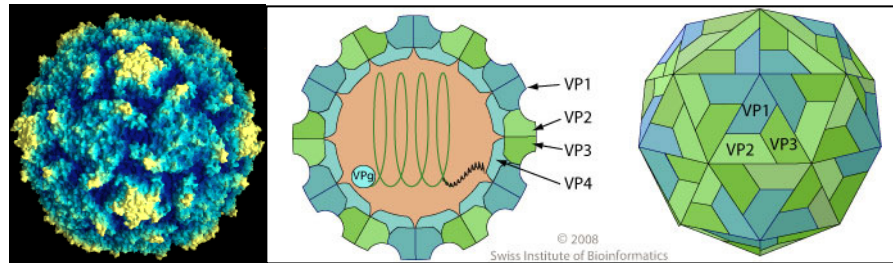
A proteína VP1 é a principal proteína do capsídeo, sendo a mais estudada. Ela apresenta altas taxas de variabilidade genética e recombinação (BAILLY et al, 2009; MCWILLIAM LEITCH et al, 2009) e tem sido amplamente utilizada para a identificação de enterovírus pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variantes em casos de meningite asséptica (DOS SANTOS et al, 2006; LEITCH et al, 2009; OBERSTE et al, 1999; PAPA et al, 2009; RAHIMI et al, 2009).

O hospedeiro apresenta uma resposta imunológica sorotipo-específica contra infecções pelos enterovírus, de modo que um indivíduo pode adquirir várias infecções por diferentes sorotipos (PALLANSCH; ROOS, 2001).

A **FIGURA 01** ilustra o capsídeo viral de um enterovírus e a localização de suas proteínas estruturais. A **FIGURA 02** mostra a organização do genoma dos enterovírus e a distribuição dos genes que são traduzidos nas proteínas supracitadas.

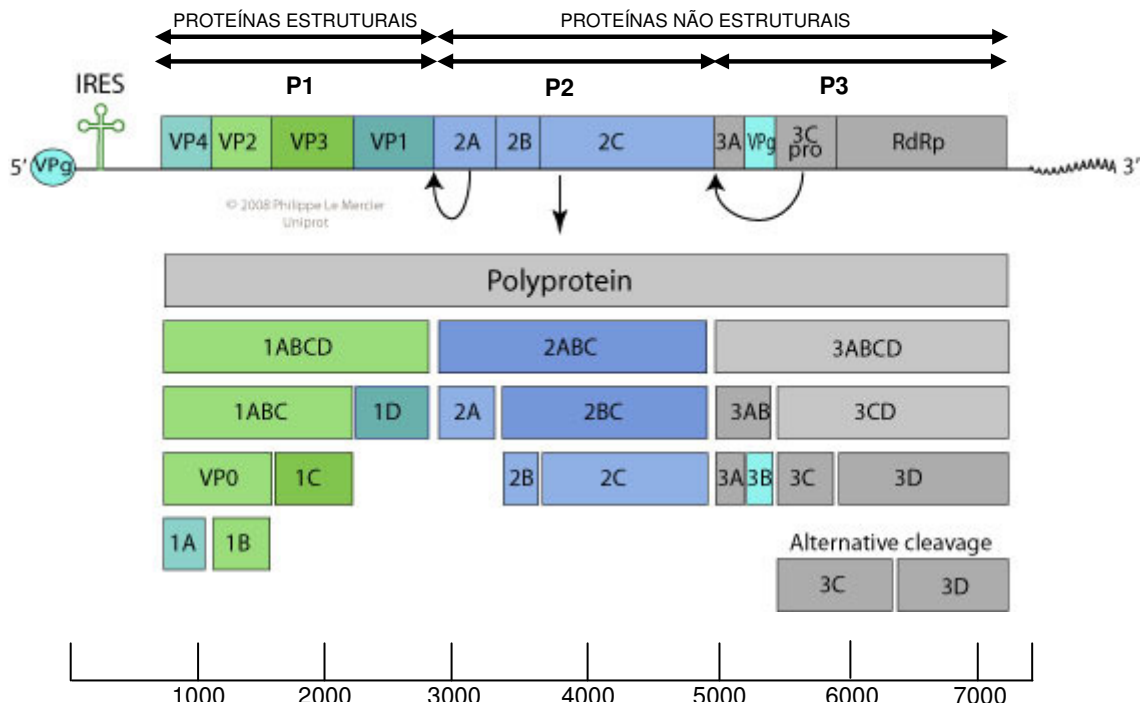
Os enterovírus são resistentes a enzimas proteolíticas, álcool e éter. Eles são estáveis, em culturas celulares, por muitos anos a baixas temperaturas ( $-70^{\circ}\text{C}$ ), por semanas a  $4^{\circ}\text{C}$  e por dias a temperatura ambiente. Por outro lado, podem ser inativados pela luz ultravioleta, formaldeído a 0,3%, cloro residual livre (0,3 a 0,5 ppm), HCl (0,1N) e pelo calor ( $50^{\circ}\text{C}$  / 30 minutos) (PALLANSCH; ROOS, 2001).

**FIGURA 01 - Esquemas do Capsídeo de um Enterovírus com as Proteínas VP1, VP2, VP3 e VP4.**



Fontes: Post-Polio Network *Home Page* (acesso em 03/12/11) e *Expasy Home Page* (acesso em 03/12/11).

**FIGURA 02 - Organização do Genoma dos Enterovírus.**



Fonte: Adaptado da *Expasy Home Page* (acesso em 03/12/11).

### 1.3.3 Ciclo replicativo dos enterovírus

O ciclo replicativo viral se inicia no momento em que ocorre a interação vírus-célula hospedeira, com a adsorção do vírion a receptores celulares específicos presentes na membrana plasmática (RACANIELLO, 2001).

Após a adsorção, o vírus é então internalizado e tem seu capsídeo fragmentado. A internalização se dá por endocitose, em alguns pontos da superfície celular revestidos internamente por clatrin, onde os receptores estão concentrados, ocorrendo a invaginação e a posterior formação de vesículas. A acidificação no interior das vesículas, devido à atuação da bomba de prótons, provoca mudanças na estrutura do vírion, resultando na liberação de VP4 e no aparecimento de sítios hidrofóbicos presentes na região amino-terminal da proteína do capsídeo VP1, ambos escondidos anteriormente na região interna do capsídeo viral. A fusão da membrana lipídica com os sítios hidrofóbicos de VP1 permite a formação de um poro e a consequente transferência do RNA do vírion para o citosol, onde ocorre a sua replicação. A proteína VPg é então removida do RNA viral por enzimas celulares.

O RNA, agindo como RNA mensageiro (RNAm), é automaticamente traduzido, sem interrupção, em uma única poliproteína que, ainda no processo de formação, é clivada autocataliticamente nos intermediários P1, P2 e P3 (RACANIELLO, 2001). O processamento da poliproteína precursora é realizado cotransducionalmente por reações intramoleculares (*in cis*), as quais são chamadas de clivagens primárias, seguidas pelo processamento secundário *in cis* ou *in trans* (intermolecular). O evento inicial na sequência de clivagens é a liberação do precursor P1 da poliproteína nascente pela protease 2A. A 2A<sup>pro</sup> é liberada da poliproteína por clivagem cotransducional na sua terminação amino. Esta clivagem é um pré-requisito para o processamento proteolítico da região precursora do capsídeo. Já a 3C<sup>pro</sup> é responsável pela clivagem primária entre 2C e 3A, separando os segmentos P2 e P3, e pela maioria das clivagens secundárias ocorridas nos intermediários P1, P2 e P3. A forma precursora 3CD<sup>pro</sup> parece catalisar eficientemente algumas clivagens ocorridas no segmento P1. O precursor P1 é clivado para produzir, inicialmente, VP0, VP1 e VP3 e, finalmente, as quatro proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP4. Os segmentos P2 e P3 são processados para darem origem às proteínas não estruturais envolvidas no processamento protéico (2A<sup>pro</sup>, 3C<sup>pro</sup>, 3CD<sup>pro</sup>) e na replicação do genoma (2B, 2C, 3AB, 3B<sup>VPg</sup>, 3D<sup>pol</sup>) (RACANIELLO, 2001).

Estudos sobre o processo de tradução dos vírus da família *Picornaviridae* demonstraram a presença, na região 5' NC do genoma viral, de uma sequência correspondente a um sítio interno de entrada de ribossomos, responsável por direcionar a tradução, o IRES

(*internal ribosome entry site*), que consiste em um elemento regulatório de 450 - 600 nt. A subunidade 40S ribossomal liga-se ao RNAm através do IRES e “desliza” até o códon de iniciação AUG (RACANIELLO, 2001).

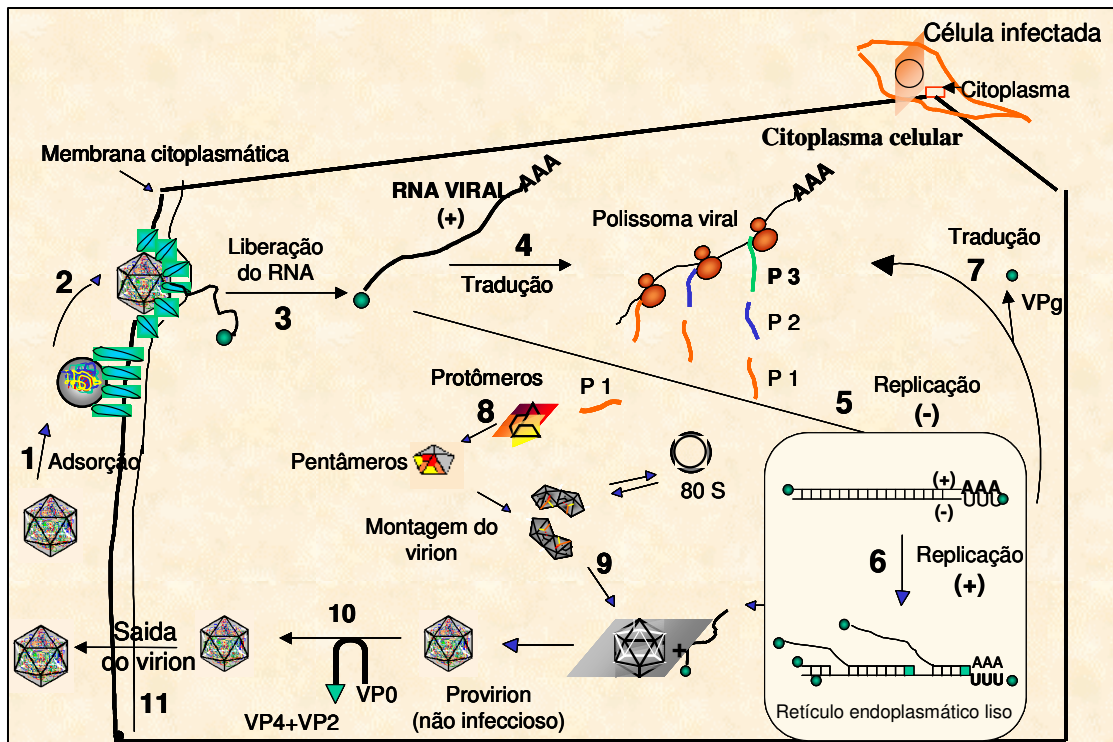
A síntese do genoma viral é obtida por uma sequência de eventos onde participam as moléculas de RNA viral, atuando como molde, e as RNA polimerases codificadas pelos vírus, além de outras proteínas virais e celulares. Todo esse processo ocorre no interior do citoplasma, fortemente associado ao retículo endoplasmático liso.

O primeiro passo na replicação do RNA viral é copiar o RNA genômico para formar uma fita complementar de polaridade negativa, a qual servirá de molde para a síntese de novas fitas de polaridade positiva. A síntese da fita complementar é iniciada na extremidade 3' NC do genoma viral e utiliza a proteína VPg como um iniciador (*primer*). A partir de uma fita complementar de polaridade negativa, várias fitas nascentes de RNA com polaridade positiva são transcritas simultaneamente pela RNA polimerase viral, formando o chamado intermediário replicativo (RACANIELLO, 2001).

Durante o início da replicação, parte do RNA positivo retorna ao citoplasma para a tradução de mais proteínas, enquanto outra parte permanece no retículo endoplasmático liso para a formação de mais centros de replicação de fita positiva. Posteriormente, as fitas positivas de RNA são acumuladas até serem empacotadas nos capsídeos. As partículas completas são liberadas pela desintegração da célula hospedeira. A **FIGURA 03** esquematiza todo o ciclo replicativo viral.

A duração de um ciclo de replicação completo, desde a infecção até a completa montagem do vírus, varia, geralmente, de 5 a 10 horas, dependendo de alguns fatores, como: pH, temperatura, sorotipo do vírus, célula hospedeira, estado nutricional da célula hospedeira e o número de partículas que a infectaram. Em condições ótimas, pode ocorrer a biossíntese de 25.000 a 100.000 partículas virais por célula, mas somente 0,1% a 10% destas são infecciosas (RACANIELLO, 2001).

FIGURA 03 – Ciclo Replicativo dos Enterovírus.



Fonte: Costa, 1999.

### 1.3.4 Variabilidade genética de echovírus 30

Devido à ausência de revisão pela RNA polimerase RNA-dependente viral, os enterovírus apresentam um alto grau de variação genética entre os diversos sorotipos e dentro de um mesmo sorotipo (LINDBERG et al, 2003).

Além disso, alguns estudos que avaliaram a dinâmica de recombinação de E30, baseada nas redes de transmissão e circulação destes vírus. Estes estudo analisaram, ainda, a taxa de recombinação entre E30 e os diferentes sorotipos constituintes da espécie B, a qual E30 pertence, e descrevem a ocorrência destes eventos como mais frequente do que anteriormente previsto. A recombinação genética é considerada atualmente como um dos principais determinantes da constante variação do genoma de enterovírus circulantes (BOUSLAMA et al, 2007; LINDBERG et al, 2003; LUKASHEV et al, 2003; MCWILLIAM LEITCH et al, 2009; MIRAND et al, 2007; SIMMONDS, 2006).

Apesar da alta variabilidade genética, a evolução molecular do gene que codifica para a proteína VP1 de E30 mostra que uma constante pressão seletiva é exercida contra substituições não-sinônimas na sequência nucleotídica desta proteína. A manutenção de

polimorfismos de aminoácidos ocorre somente em algumas poucas posições dispersas na VP1 (BAILLY et al, 2009).

Em anos recentes tem sido observada uma continuada circulação de E30 no Brasil (CASTRO et al, 2009; DOS SANTOS et al, 2006; PINTO JUNIOR et al, 2009). Este é um dos sorotipos de enterovírus mais prevalentes, estando frequentemente envolvido em casos esporádicos e surtos de meningite asséptica em diversos países, o que contribui para sua circulação ativa na população em geral (BAILLY et al, 2002; CASTRO et al, 2009; CHOI et al, 2010; DOS SANTOS et al, 2006; HAYASHI et al, 2009; JULIÁ et al, 2009; PINTO JUNIOR et al, 2009; SAVOLAINEN; HOVI; MULDER, 2001; TRALLERO et al, 2000).

A análise filogenética permite a reconstrução da história evolutiva dos vírus a partir de árvores filogenéticas obtidas com base em informações contidas nas sequências de nucleotídeos do genoma viral, genes completos ou sequências parciais desses genes. Com este método de análise, é possível realizar estudos de diversidade intragenótipo, com a subdivisão dos genótipos em linhagens e sublinhagens, diferenciadas geneticamente. Esses métodos contribuem para um melhor entendimento dos mecanismos de evolução e adaptação dos vírus ao longo do tempo (PAGE; HOLMES, 1998).

Diversos estudos reportaram a variabilidade genética de E30 isolados em diversos países utilizando principalmente o gene da proteína VP1 (BAILLY et al, 2002, 2009; CABRERIZO et al, 2008; KE et al, 2011; LEITCH et al, 2009; LÉVÊQUE et al, 2010; OBERSTE et al, 1999; PALACIOS et al, 2002; SAVOLAINEN; HOVI; MULDER, 2001).

## 1.4 FLAVIVÍRUS

### 1.4.1 Classificação taxonômica dos flavivírus

A família *Flaviviridae* (do latim *flavus* - amarelo) inclui os gêneros *Flavivirus*, *Hepacivirus* e *Pestivirus*. O gênero *Flavivirus* possui cerca de 70 vírus descritos, dos quais 40 estão associados com doença em humanos (BURKE; MONATH, 2001). Destes, 11 já foram identificados no Brasil: Bussuquara Vírus (BUSV), Cacipacoré Vírus (CPCV), Dengue Vírus 1 a 4 (DENV), Iguape Vírus (IGUV), Ilhéus Vírus (ILHV), Rocio Vírus (ROCV), Vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV) e Vírus da Febre Amarela (YFV) (CHÁVEZ; FIGUEIREDO, 2006; FIGUEIREDO, 2000; GOULD; SOLOMON, 2008). A **TABELA 03**

apresenta algumas características epidemiológicas dos flavivírus que já foram identificados no Brasil.

Os flavivírus são classificados como arbovírus (*arthropod-borne virus*), termo aplicável a todos os vírus que se mantêm na natureza através de um ciclo que envolve sua transmissão ao hospedeiro vertebrado pela picada de um artrópode hematófago susceptível infectado. As infecções causadas por arbovírus em humanos são incidentais (GOULD; SOLOMON, 2008).

Com base em características imunológicas, os flavivírus estão divididos em nove grupos antigênicos, dos quais seis são de importância médica. São eles: Dengue vírus (DENV), vírus da febre amarela (YFV), complexo da encefalite japonesa (JEC), complexo dos vírus da encefalite transmitida por carrapato (TBEC), Modoc vírus e Rio Bravo vírus. A maioria destes vírus é responsável por alta morbidade e mortalidade em todo o mundo (BURKE; MONATH, 2001; DAVIS et al, 2006; GOULD; SOLOMON, 2008; ROCCO et al, 2005).

O complexo da encefalite japonesa (JEC) inclui flavivírus conhecidos por causarem doenças que atingem o sistema nervoso central (SNC) como encefalites, meningoencefalites e meningites. Desse complexo fazem parte JEV, WNV e SLEV, entre outros (BURKE; MONATH, 2001; CHADWICK, 2005; ROCCO et al, 2005).

TABELA 03 - Características Epidemiológicas dos Flavivírus já Identificados no Brasil.

Vírus	Ano do Primeiro Isolamento	Local de Isolamento	Fonte de Isolamento	Distribuição Geográfica	Principal Vetor	Principal Hospedeiro	Doença em Humanos
<b>Bussuquara</b>	1956	Brasil	Primata	Brasil	<i>Culex</i> spp	?	Doença Febril
<b>Cacipacoré</b>	1977	Brasil	Ave	América do Sul	?	Aves	?
<b>Dengue 1</b>	1944	Havaí	Homem	Regiões Tropicais e Sub-Tropicais	<i>A. aegypti</i>	Homem	Dengue, Doença Febril, Vasculopatias
<b>Dengue 2</b>	1944	Nova Guiné					
<b>Dengue 3</b>	1957	Filipinas					
<b>Dengue 4</b>	1957	Filipinas					
<b>Encefalite de Saint Louis</b>	1933	Estados Unidos	Homem	Américas Central e do Sul	<i>Culex</i> spp	Aves	Encefalite, Meningite, Meningoencefalite
<b>Iguape</b>	1979	Brasil	Roedor	Brasil	?	Aves?	?
<b>Ilhéus</b>	1944	Brasil	Pool de Mosquitos	Américas Central e do Sul	<i>Culex</i> spp?	Aves	Doença Febril
<b>Rocio</b>	1975	Brasil	Homem	Brasil	<i>Culex</i> spp?	Aves	Encefalite
<b>Febre Amarela</b>	1927	Gana	Homem	África subsaariana e América do Sul	<i>Aedes</i> spp / <i>Haemagogus</i> spp	Primatas	Febre Amarela

Fonte: BURKE; MONATH, 2001; GOULD; SOLOMON, 2008.

#### 1.4.2 Composição e características físico-químicas dos flavivírus

Os flavivírus são vírus esféricos, com diâmetro entre 40 a 60 nm. Eles possuem genoma RNA fita simples polaridade positiva não segmentado. O nucleocapsídeo apresenta simetria icosaédrica e é composto pelo RNA viral associado ao capsídeo, que é composto por um único tipo de proteína (C). Este nucleocapsídeo é envolto por um envelope lipoprotéico originário da célula hospedeira, com glicoproteínas ancoradas, formando projeções na superfície da partícula viral (BURKE; MONATH, 2001; GOULD; SOLOMON, 2008).

O genoma completo possui aproximadamente 11 Kb e peso molecular de cerca de  $4 \times 10^6$  Da. Ele é composto por uma região 5' não codificante de aproximadamente 120 nucleotídeos, uma região codificante com uma única fase de leitura aberta e uma região terminal 3' não codificante, com cerca de 500 nucleotídeos. A extremidade 5' apresenta a



estrutura cap 5' (7- Metil Guanosina) e, diferente de outros vírus RNA fita simples, não apresenta cauda poli-A na extremidade 3'.

As regiões não codificantes do genoma são importantes para a expressão de proteínas virais. A região codificante contém aproximadamente 10 Kb e codifica uma poliproteína que é clivada em três proteínas estruturais e sete proteínas não-estruturais. As proteínas estruturais são: proteína do capsídeo (C), pré-membrana (PrM), que é precursora da proteína M, e proteína do envelope (E). As proteínas não-estruturais são: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (BURKE; MONATH, 2001; GOULD; SOLOMON, 2008).

A proteína C é a primeira a ser formada, no processo de clivagem da poliproteína, e compõe o capsídeo viral. Ela possui cerca de 10 kDa e o fato de ela ser carregada positivamente possibilita sua associação com o genoma viral, para a formação do nucleocapsídeo.

A proteína PrM possui aproximadamente 22 kDa e origina a proteína M do vírion ao sofrer uma clivagem proteolítica. A proteína M tem peso molecular de oito kDa, sendo importante para a infecciosidade viral e para a organização da estrutura viral.

A glicoproteína E é a principal e a maior proteína estrutural da superfície dos flavivírus (51-60 kDa). Ela apresenta projeções glicoprotéicas de 5-10 nm formando espículas no envelope viral e auxilia no processo de automontagem do vírus, interação com receptores específicos existentes nas células-alvo e fusão de membranas. Além disso, ela desempenha atividade hemaglutinante. Essa proteína estrutural é o principal alvo para anticorpos neutralizantes e inibidores de hemaglutinação (BURKE; MONATH, 2001; GOULD; SOLOMON, 2008).

A proteína NS1 apresenta peso molecular de 42-50 kDa, existindo sob duas formas diferentes: uma quando o vírus encontra-se na superfície da célula e outra encontrada em suspensão nas culturas de células infectadas com flavivírus. Ela é uma subunidade do complexo de replicação viral, juntamente com a NS4A, e age no processo de maturação viral.

A proteína NS2A é uma proteína transmembrana de aproximadamente 20 kDa e ao se associar com outras duas proteínas não estruturais, NS4A e NS4B, colabora na replicação do RNA viral. Ela também participa da liberação dos vírions.

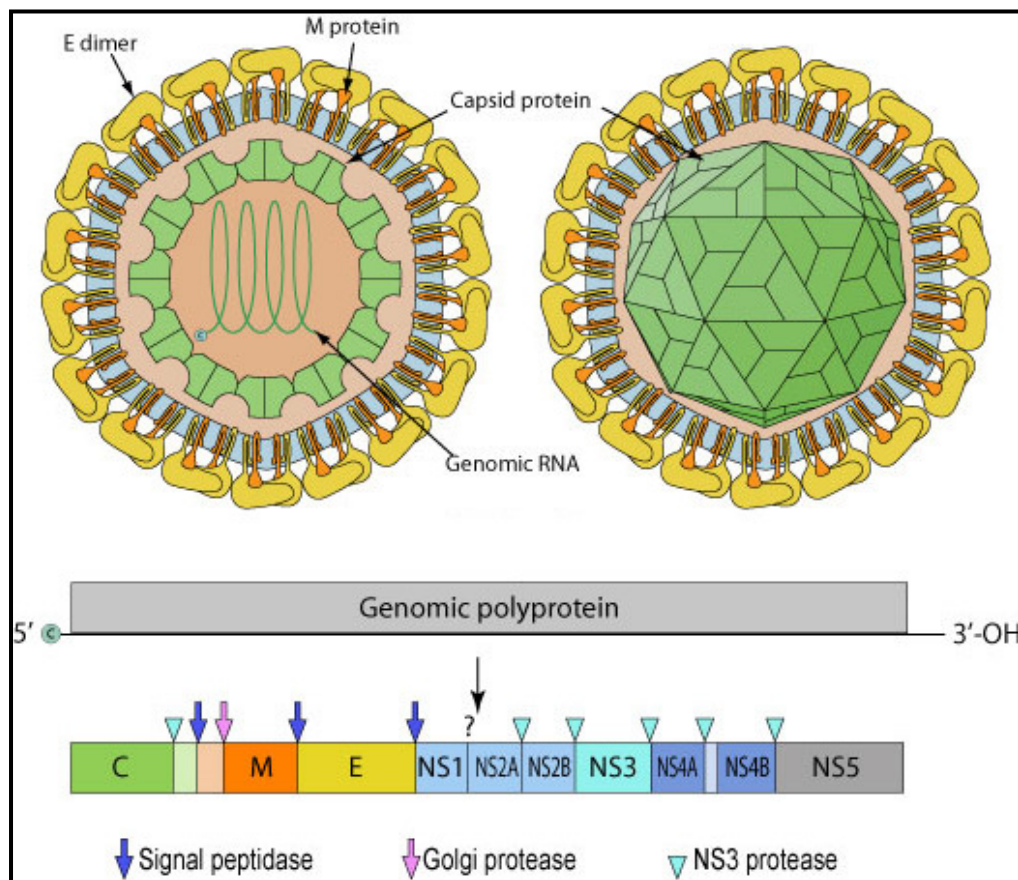
A NS3 possui 68-70 kDa, é bastante conservada e acumula funções de Helicase/NTPase, serina protease e RNA trifosfatase. A NS2B se complexa com a NS3, agindo como um cofator para a função proteolítica da NS3.

A NS5 é a maior proteína não estrutural dos flavivírus, com 103-104 kDa, é altamente conservada, o que a torna muito útil para estudos de identificação molecular de flavivírus

(GOULD; SOLOMON, 2008; MOUREAU et al, 2007; SCARAMOZZINO et al, 2001). Ela apresenta funções de RNA polimerase e metil-transferase, estando envolvida com a metilação da estrutura cap 5' (BURKE; MONATH, 2001; GOULD; SOLOMON, 2008).

A **FIGURA 04** ilustra a partícula viral completa (vírion) de um flavivírus, com suas proteínas estruturais e a organização do seu genoma.

**FIGURA 04 - Esquema do vírion e do genoma dos Flavivírus.**



Fonte: Adaptado da *Expasy Home Page* (acesso em 10/11/10).

Os flavivírus apresentam em sua composição 6% de RNA, 66% de proteína, 9% de carboidratos e 17% de lipídios. Sua densidade é de 1,19 a 1,23 g / mL em gradiente de cloreto de céσιο e o coeficiente de sedimentação está entre 170 e 210S. Pelo fato de possuírem um envelope lipoprotéico, os flavivírus são facilmente inativados por solventes orgânicos e detergentes iônicos e não iônicos. Também são sensíveis aos raios ultravioleta e à digestão proteolítica (BURKE; MONATH, 2001).

### 1.4.3 Ciclo replicativo dos flavivírus

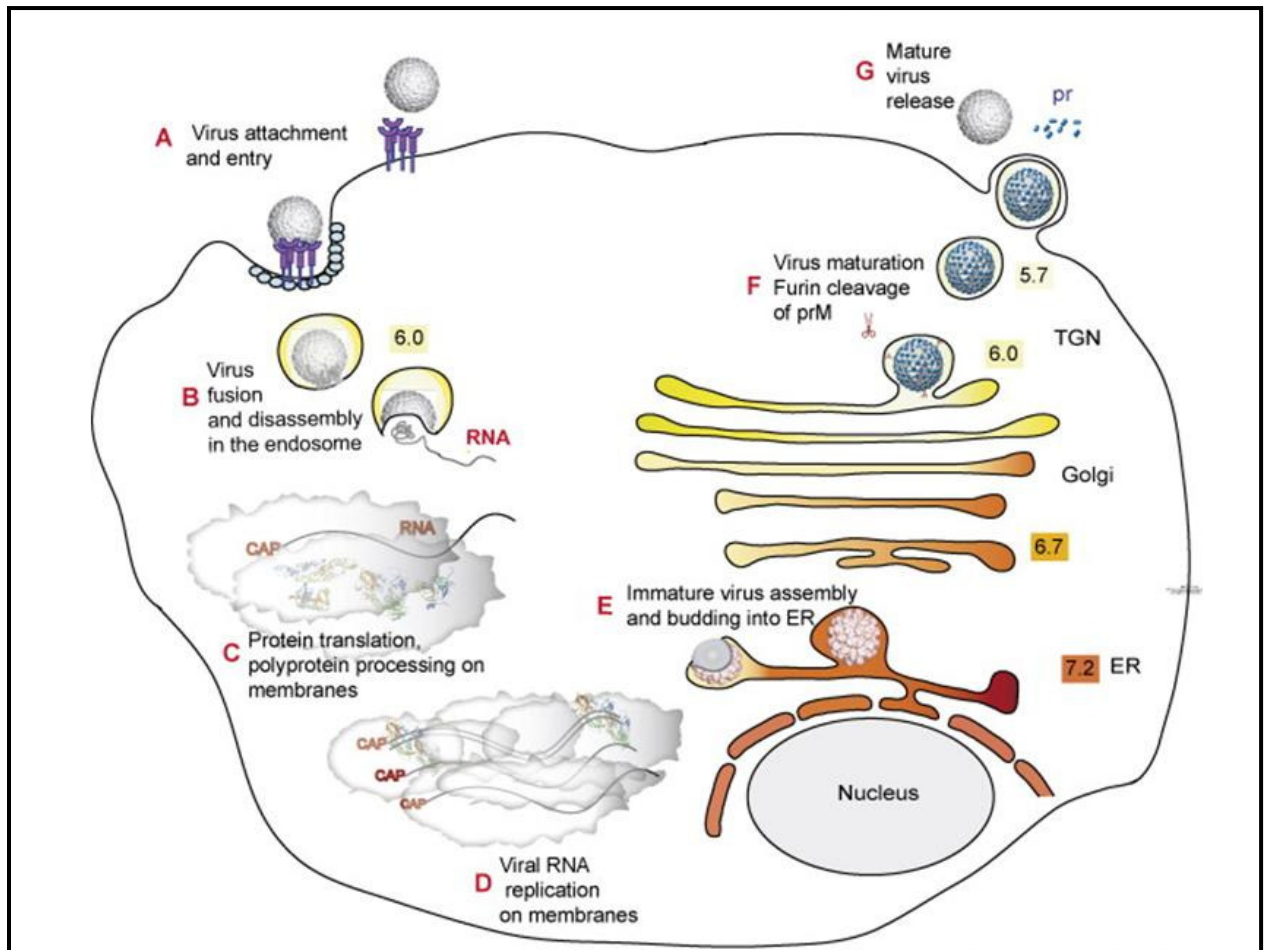
O ciclo replicativo dos flavivírus inicia-se com a entrada das partículas virais na célula por endocitose clatrina-dependente, mediada por receptores celulares específicos, como algumas lectinas e glicosaminoglicanos (KAUFMANN; ROSSMANN, 2011). À medida que a vesícula endocítica se acidifica, ocorre uma mudança conformacional na proteína E do envelope, que leva a fusão do envelope viral à membrana da vesícula endocítica, a liberação do nucleocapsídeo e desnudamento no citoplasma celular (BURKE; MONATH, 2001; GOULD; SOLOMON, 2008).

Como o ácido nucléico viral consiste em RNA fita simples polaridade positiva, age como RNA mensageiro, sendo logo traduzido em uma poliproteína com aproximadamente 3300 resíduos de aminoácidos, que é clivada co- e pós- traducionalmente em dez proteínas por proteases virais e celulares. As três proteínas estruturais estão localizadas na porção amino-terminal.

A tradução ocorre associada ao retículo endoplasmático rugoso. A replicação do ácido nucléico se inicia com a síntese de uma fita negativa complementar ao RNA viral, que é utilizada como molde para as fitas de RNA genômico de polaridade positiva. O empacotamento da nova partícula também ocorre no retículo endoplasmático, onde proteínas do capsídeo se complexam ao genoma viral, formando o nucleocapsídeo. Este brota do retículo, sendo neste momento revestido com as proteínas do envelope. Ele se associa às proteínas PrM e E para formar as partículas imaturas e a proteína prM é clivada por uma protease celular tipo furina na rede trans-Golgi.

A última clivagem da proteína PrM em M, catalisada por furinas, e a dissociação do peptídeo Pr da partícula induz a reorganização e maturação da partícula viral (vírion). As partículas virais nascentes são liberadas por exocitose. A **FIGURA 05** esquematiza o ciclo replicativo dos flavivírus (BURKE; MONATH, 2001; GOULD; SOLOMON, 2008, LEYSEN; DE CLERCQ; NEYTS, 2000).

**FIGURA 05 – Ciclo Replicativo dos Flavivírus.**



Fonte: Wen Jiang Home Page (acesso em 01/11/10).

### 1.5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA MENINGITE ASSÉPTICA

As manifestações clínicas da meningite asséptica podem variar de acordo com a idade do paciente, fatores associados à infecção, como presença de outras doenças concomitantes e imunossupressão e, principalmente, dependendo do agente etiológico envolvido. A maioria dos indivíduos infectados permanece assintomática (DAVIS et al, 2006; KUMAR, 2005). Tais manifestações são em geral mais leves que os graves sintomas e sinais presentes na meningite purulenta, que surgem de forma repentina e progridem rapidamente, podendo levar o paciente a óbito em questão de horas ou deixar severas sequelas neurológicas (BRASIL, 2005).

Os sintomas relatados mais importantes e frequentes nas meningites assépticas e meningoencefalite incluem febre, cefaléia intensa, fotossensibilidade, náuseas, vômitos,

sonolência, confusão mental e rigidez na nuca, sendo esta a característica clínica mais importante. Ela é ocasionada pela irritação das leptomeninges nas raízes raquianas cervicais e torácicas superiores. Outros sinais conhecidos também podem ocorrer, como os de Kernig e de Brudzinski. Em recém-nascidos, os sinais são identificados com dificuldade. Os sintomas desaparecem naturalmente em 7-10 dias e o paciente, na maioria dos casos, evolui de forma benigna, recuperando-se completamente (KUMAR, 2005; PALLANSCH; ROOS, 2001).

Entre os indivíduos infectados por WNV, além das manifestações clínicas clássicas, pode ocorrer, ainda, mialgia, calafrios e tremores. Aproximadamente 80% são assintomáticos e 1% desenvolve doença neuroinvasiva, que é a forma mais grave da infecção por este agente, em que ocorre meningite e/ou encefalite. A forma mais branda de doença causada por WNV é conhecida como Febre do Nilo Ocidental, com sintomas inespecíficos e ausência de acometimento neurológico (DAVIS et al, 2006; JULIAN et al, 2003; KRAMER; LI; SHI, 2007; MOSTASHARI et al, 2001; NASH et al, 2001).

Em regiões tropicais, as infecções neuroinvasivas severas e fatais causadas por flavivírus em geral são raras, principalmente pela conhecida existência de reação cruzada dos anticorpos para os diferentes flavivírus (BURKE; MONATH, 2001; CHÁVEZ; FIGUEIREDO, 2006).

As manifestações clínicas das infecções por SLEV comumente são febre aguda e sintomas de encefalite, podendo também causar meningite (SPINSANTI et al, 2008).

## 1.6 DIAGNÓSTICO DA MENINGITE ASSÉPTICA

O diagnóstico da meningite asséptica pode ser feito por várias técnicas associadas ao diagnóstico clínico e depende do agente etiológico envolvido. Dentre elas, podemos citar o isolamento do agente etiológico a partir de amostras clínicas em cultura de células, onde pode ser observado o efeito citopático viral. Este método ainda é considerado o método-padrão de diagnóstico de enterovírus (WHO, 2004). Os enterovírus podem ser isolados a partir de materiais clínicos como fezes, líquido cefalorraquidiano (LCR), soro, secreção nasofaríngea ou material histopatológico. Várias linhagens celulares podem ser utilizadas: RD (célula de linhagem contínua proveniente de rabdiosarcoma humano), HEp2 (célula de carcinoma epidermóide de laringe humana), HeLa e Vero, entre outras (LEE; DAVIES, 2007; PALLANSCH; ROOS, 2001).

Para o isolamento de Flavivírus, podem ser utilizados soro, LCR ou material histopatológico e culturas celulares como C6-36, AP-61, VERO, BHK-21 e LLC-MK2 ou através de inoculação intracerebral em camundongos recém-nascidos (BURKE; MONATH, 2001; DAVIS et al, 2006; GOULD; SOLOMON, 2008).

Esta metodologia, porém, requer um tempo relativamente longo (até 14 dias) para uma identificação positiva (BURKE; MONATH, 2001; LEE; DAVIES, 2007; PALLANSCH; ROOS, 2001). O isolamento viral pode ser mal-sucedido devido a baixos títulos virais em algumas amostras clínicas, punção tardia do LCR e também devido ao fato de alguns agentes virais, como Coxsackievírus A, não se replicarem em cultivos celulares de uso rotineiro (ISHIKO et al, 2002; JAQUES et al, 2003; LANDRY; GARNER; FERGUSON, 2003; SANTOS et al, 2002).

Ensaio de neutralização de infecciosidade viral, com o uso de soros hiperimunes específicos também são utilizados na identificação viral. Para os flavivírus, a técnica de imunofluorescência, o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o teste de neutralização por redução em placa (PRNT) são recomendados (BURKE; MONATH, 2001; GOULD; SOLOMON, 2008). O diagnóstico sorológico desses vírus pode ser dificultado pela existência de reação cruzada entre alguns flavivírus (BURKE; MONATH, 2001; BUXBAUM et al, 2001; GOULD; SOLOMON, 2008; KUMAR, 2005). A confirmação de um caso suspeito de WNV em testes sorológicos pode ser realizada pela PRNT de soro ou LCR ou pela detecção de antígeno ou genoma viral em soro, LCR ou material histopatológico (BRASIL 2009; DAVIS et al, 2006).

Nas últimas décadas o desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais vem permitindo a identificação de numerosos agentes etiológicos, proporcionando a ampliação do conhecimento da etiologia e epidemiologia desta doença, e contribuindo muito para sua vigilância. As técnicas convencionais supracitadas, utilizadas para detecção e identificação dos agentes no LCR, vêm sendo complementadas atualmente com técnicas moleculares, como a PCR e suas variantes, como RT-PCR, Nested PCR, PCR em tempo real, Multiplex PCR, e sequenciamento nucleotídico (ARCHIMBAUD et al, 2004; BRITTO et al, 2005; BROWN et al, 2003; HEIM; SCHUMANN, 2002; JACQUES et al, 2003; LEE et al, 2002; LEITCH et al, 2009; MORAES BRONZONI et al, 2005; NIX; OBERSTE; PALLANSCH, 2006; OBERSTE et al, 1999, 2000, 2001, 2006; PAPA et al, 2009; RAHIMI et al, 2009; RE et al, 2008; VERSTREPEN; BRUYNSEELS; MERTENS, 2002), que são mais sensíveis, em comparação com os cultivos celulares, permitindo a detecção de um número reduzido de cópias do genoma viral na amostra clínica, além de apresentar elevada especificidade e rapidez

(BENSCHOP et al, 2010; BRITTO et al, 2005; BUCK; WIESEMANN; STEWART, 2002; DEBIASI; TYLER, 2004; DOS SANTOS et al, 2006; JAQUES et al, 2003; MORAES BRONZONI et al, 2005; OBERSTE et al, 1999; OOI et al, 2010; RAMERS et al, 2000). Tais características permitem que estes ensaios diagnósticos colaborem com o controle epidemiológico deste importante agravo em saúde pública (BRASIL, 2009; BURKE; MONATH, 2001; NIGROVIC; CHIANG, 2000; OBERSTE et al, 1999).

É comum haver confusão no diagnóstico entre a meningite de etiologia viral e a de etiologia bacteriana parcialmente tratada, pois em ambas o LCR permanece com o aspecto límpido (BRASIL, 2005). Para diferenciar precocemente a meningite viral da bacteriana, alguns marcadores citoquímicos como o lactato e a procalcitonina podem ser utilizados (VIALLO et al, 2011). Também é importante a realização de diagnóstico diferencial entre as meningites e meningoencefalites e a doença de Lyme, que apresentam sinais clínicos muito semelhantes entre si (BRASIL, 2005, 2009; NEGRINI; KELLEHER; WALD, 2000).

## 1.7 TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA MENINGITE ASSÉPTICA

Não há tratamento específico para a meningite asséptica, uma vez que é necessário o conhecimento da etiologia da síndrome. A maioria dos pacientes recupera-se naturalmente, havendo, normalmente, apenas um tratamento sintomático, com recomendação de repouso, ingestão de bastante líquido e prescrição de analgésicos e antitérmicos (KUMAR, 2005).

Nas infecções por herpesvírus, Aciclovir via endovenosa ou Valaciclovir via oral são recomendados (TAVARES, 2001). Para os casos com envolvimento de enterovírus, pode ser recomendada a administração de Pleconaril ou Ribavirina (RHOADES et al, 2011). Para WNV, não há vacina para uso em seres humanos e está sendo avaliado o uso de imunoglobulina humana para casos mais severos (ZEINAD; NOVARETTI; CHAMONE, 2004).

Em termos de prevenção, é necessário levar em consideração os possíveis modos de transmissão da meningite asséptica e da meningoencefalite.

Para os casos em que enterovírus estão associados, a contaminação fecal-oral é a principal forma de transmissão. Por isso, um dos hábitos de higiene mais comuns, a lavagem das mãos, é o método mais eficaz de prevenção da doença. Além disso, a desinfecção adequada de superfícies e objetos contaminados e a limpeza frequente de reservatórios de água e piscinas, também colaboram efetivamente para evitar ou controlar a propagação destes

agentes virais, levando, inclusive, à redução do risco de ocorrência de surtos (PALLANSCH; ROOS, 2001).

A dinâmica de transmissão dos arbovírus, como um todo, depende de muitos fatores e condições ambientais, como: densidade populacional alta somada a um elevado percentual de indivíduos susceptíveis ao agente viral circulante, deficiência na coleta e destinação de resíduos sólidos, temperatura e umidade adequadas para o desenvolvimento do mosquito vetor, levando à existência deste em altos índices (DAVIS et al, 2006; GOULD; SOLOMON, 2008).

Iniciativas individuais, principalmente, coletivas e governamentais de prevenção de alguns destes fatores podem colaborar com a minimização da infestação dos vetores e da consequente transmissão de doenças a eles associadas. Algumas medidas profiláticas são a redução da exposição à picada dos mosquitos, uso de repelentes e o controle da população de mosquitos, com a eliminação de reservatórios de água limpa e parada, aplicação de larvicidas e uso de pesticidas, entre outros (BRASIL, 2009; DAVIS et al, 2006; GOULD; SOLOMON, 2008).

## 1.8 PATOGENIA DA MENINGITE ASSÉPTICA

O trato gastrointestinal e o trato respiratório são as principais portas de entrada para os enterovírus e outros agentes da meningite (PALLANSCH; ROOS, 2001).

Apesar de a patogenia dos arbovírus normalmente se iniciar com a picada de mosquitos infectados, WNV pode ter como porta de entrada a via oral. Mais raramente, pode ser transmitido ao indivíduo por transfusão de sangue e transplante de órgãos contaminados e, ainda, pela amamentação e transmissão intra-uterina (IWAMOTO et al, 2003; KOMAR; CLARK, 2006; PAISLEY et al, 2006).

No caso dos enterovírus, após a entrada no hospedeiro, há uma replicação viral em alguns sítios de implantação, como amígdalas, linfonodos da orofaringe e dos intestinos. Daí pode ocorrer uma viremia transitória ou haver disseminação sistêmica, com replicação viral em localizações secundárias. Dependendo do sorotipo, os vírus podem migrar para o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Periférico (SNP), por via neural, olfativa ou hematogênica, causando meningite, encefalite ou meningoencefalite, ou ir para outros tecidos-alvo, como a pele e o miocárdio, causando casos de doenças exantemáticas ou miocardite, por exemplo. O



período de incubação desses vírus pode levar de 12 horas a 35 dias (LASSMAN; ZIMPRICH; ROSSLER, 1991; PALLANSCH; ROOS, 2001).

Os flavivírus penetram na pele do indivíduo pela picada do mosquito e se replicam localmente, preferencialmente em monócitos, macrófagos e células dendríticas de Langerhans. Após a amplificação periférica, os vírus migram para os linfonodos e para a circulação sistêmica (viremia primária), podendo avançar pelo sistema reticuloendotelial, aumentando a viremia (viremia secundária). Eles alcançam a barreira hematoencefálica e penetram no SNC por mecanismos desconhecidos. Além de se replicarem nos neurônios, também induzem apoptose nessas células. O período de incubação do WNV é de 3 a 14 dias (BURKE; MONATH, 2001; DAVIS et al, 2006; PASTORINO et al, 2010).

## 1.9 EPIDEMIOLOGIA DA MENINGITE ASSÉPTICA

A meningite de etiologia viral é o tipo mais comum de meningite asséptica, representando uma significativa causa de morbidade. Ela apresenta caráter cosmopolita e, dependendo do agente etiológico envolvido, pode atingir principalmente crianças (enterovírus) ou adultos e idosos (WNV), sem predileção por sexo, de forma epidêmica ou em casos esporádicos (DAVIS et al, 2006; GOULD; SOLOMON, 2008; KUMAR, 2005; PALLANSCH; ROOS, 2001).

Nas últimas décadas houve uma mudança no quadro epidemiológico das meningites assépticas devida à introdução de vacinas anti-virais (poliomielite, sarampo e caxumba) pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde (MS), e ao surgimento de metodologias de diagnóstico mais sensíveis e específicas, que têm aumentado a possibilidade de identificação dos agentes etiológicos (OBERSTE et al, 1999; PALLANSCH; ROOS, 2001).

A população em geral está exposta aos agentes da meningite asséptica. Entretanto, a maioria dos indivíduos infectados não apresenta sinais característicos de doença. Esta baixa morbidade pode ser encarada positivamente, pois poucos adoecem, dentre os indivíduos infectados. Por outro lado, numa visão epidemiológica, isto é preocupante, uma vez que muitos indivíduos apresentam infecção inaparente e podem transmitir o agente etiológico a outras pessoas. Dessa forma, torna-se muitas vezes difícil, por parte das autoridades de saúde, a avaliação da fonte de infecção (PALLANSCH; ROOS, 2001).

Os enterovírus estão amplamente disseminados na natureza e têm maior incidência no verão e outono, nas regiões temperadas, e não há um padrão sazonal evidente em regiões tropicais (KUMAR, 2005).

Algumas espécies de mosquitos sobrevivem ao inverno, permitindo manter a transmissão de arbovírus mesmo em baixas temperaturas em países de clima temperado. Em países tropicais, devido às condições climáticas favoráveis, pode haver transmissão durante o ano inteiro (BRASIL, 2009; DAVIS et al, 2006).

A introdução de WNV no continente americano ocorreu em 1999, causando um grande surto de doença febril e encefalite em Nova York (NASH et al, 2001). Até meados da década de 1990 ele era restrito à Ásia ocidental, Oriente Médio, Europa e África (BARZON et al 2009; BRASIL, 2009; DAVIS et al, 2006). Desde então, ele é considerado endêmico na América do Norte e tem se deslocado em direção ao hemisfério sul americano, provavelmente através do movimento migratório de aves, que são seu principal reservatório e amplificador (CHÁVEZ; FIGUEIREDO, 2006; DAVIS et al, 2006; FIGUEIREDO, 2007).

## 1.10 AÇÕES DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE

As primeiras ações para o controle das doenças e epidemias, como a quarentena e o isolamento, são práticas muito antigas. A partir da segunda metade do século XIX, com o desenvolvimento da microbiologia, e com investigações de campo voltadas para a identificação dos elos da cadeia de transmissão das doenças infecciosas, surgiu a idéia de vigilância, no sentido da observação sistemática dos contatos dos doentes (PALMEIRA, 2000).

No início do século XX, com a aceleração do desenvolvimento industrial e urbano, a saúde começou a ser vista como uma questão social pela possibilidade real de ocorrência de doenças de massa e, por conseguinte, pela necessidade de controlar doenças que poderiam atrapalhar o desenvolvimento das atividades econômicas, dependentes de mão de obra (COSTA; ROZENFELD, 2000). E, para a determinação de medidas de controle das infecções em geral tornou-se necessário conhecer e detectar os agentes etiológicos envolvidos nos casos.

Com as campanhas de erradicação de diversas doenças infecciosas, iniciadas após a segunda guerra mundial, a vigilância deixou de ser feita sobre as pessoas (doentes e contatos) e passou a ter como objeto a doença. Consolidou-se, assim, a idéia de vigilância

epidemiológica como observação ativa e sistemática da distribuição da ocorrência de agravos, a avaliação da situação epidemiológica com base na análise das informações obtidas, e a definição das medidas de prevenção e controle adequadas. O conjunto de atividades de vigilância epidemiológica é, em geral, voltado para agravos específicos, e tem como objetivo final a prevenção, sendo indispensável à elaboração, ao acompanhamento e à avaliação de programas de saúde (PALMEIRA, 2000).

Além da ampliação do objeto dos “programas de controle”, que tendem a ultrapassar o limite estreito das doenças infecciosas e parasitárias, e dirigem-se a grupos populacionais expostos a riscos diferenciados de adoecer e falecer, como os programas de saúde materno-infantil, do trabalhador e do idoso, têm sido formuladas e implementadas propostas dirigidas à montagem de “sistemas de vigilância epidemiológica”, cuja tradução operacional seria uma ampla rede de unidades geradoras de dados que permitam a adoção de decisões, a execução de ações de investigação e de controle e a visualização do impacto das doenças e de seus agentes sobre a saúde da população (TEIXEIRA; PAIM; VILLASBÔAS, 2000).

A identificação dos fatores de risco e o conhecimento acerca da distribuição dos agentes etiológicos envolvidos no estabelecimento das doenças infecto-contagiosas, entre outras, vêm colaborando com a implementação desse processo de vigilância em saúde e demandando a elaboração de estratégias de ação nos campos da Saúde Pública e no seu ramo mais complexo, a Vigilância Sanitária, cujas ações visam desde a proteção, promoção e recuperação até a reabilitação da saúde, através da eliminação, redução e prevenção de riscos à saúde (TEIXEIRA; PAIM; VILLASBÔAS, 2000).

Abaixo segue transcrito o artigo e respectivo parágrafo em que a Lei Orgânica da Saúde, nº 8.080, de 19 de Setembro de 1990 (BRASIL, 1990) se remete ao direito do ser humano à saúde e ao dever do Estado de garanti-la.

*“Art. 2 - A saúde é um direito fundamental do ser humano, devendo o Estado prover as condições indispensáveis ao seu pleno exercício.*

*§ 1 - O dever do Estado de garantir a saúde consiste na formulação e execução de políticas econômicas e sociais que visem à redução de riscos de doenças e de outros agravos e no estabelecimento de condições que assegurem acesso universal e igualitário às ações e aos serviços para a sua promoção, proteção e recuperação”.*

As áreas que constituem objeto de atenção da vigilância em saúde representam incontestavelmente, ou deveriam representar, uma grande preocupação das autoridades

governamentais. Estas, por sua vez, devem estar imbuídas de uma constante motivação em estabelecer de fato uma vigilância em saúde no Brasil, que fomente um avanço verdadeiro no processo de desenvolvimento do país.

Segundo o Guia de Vigilância Epidemiológica (BRASIL, 2009), são imprescindíveis o planejamento e a execução do Programa de Investigações Epidemiológicas de Casos e Epidemias, que tem como objetivos: a) identificar a fonte e modos de transmissão; b) identificar grupos expostos a maior risco; c) verificar os fatores determinantes; d) confirmar o diagnóstico; e) determinar as principais características epidemiológicas, orientando medidas de controle para impedir a ocorrência de novos casos.

Dentre as medidas adotadas frente a um caso ou epidemia de alguma doença, inclusive a meningite asséptica, estão a assistência médica ao(s) paciente(s), proteção do restante da população, e a execução de um roteiro de investigação de casos, que inclui etapas de confirmação do diagnóstico da doença e confirmação da epidemia, pela identificação de um agente etiológico comum aos casos. Este roteiro inclui ainda a coleta de dados sobre o(s) caso(s), busca de evidências sobre fontes de contágio, período de duração da epidemia, modos de transmissão, distribuição geográfica da epidemia, atributos dos grupos envolvidos, como faixa etária, sexo e grupo social, e verificação de fatores de risco. Outras etapas são a busca ativa de casos e o processamento e análise dos dados para elaboração de um relatório da investigação.

O processo citado anteriormente de confirmação da existência de um surto ou epidemia envolve o estabelecimento das condições do estado epidêmico, que diz respeito a uma situação dinâmica de epidemia ou surto e a caracterização desse evento. O conceito de epidemia é uma elevação do número de casos de uma doença ou agravo, em um determinado lugar e período de tempo, caracterizando de forma clara, um excesso em relação à frequência esperada da doença. Um surto consiste num tipo de epidemia em que os casos se restringem a uma área geográfica pequena e bem delimitada, ou a uma população institucionalizada, como creches, quartéis, etc.. Para a confirmação de um desses eventos, é importante que o nível endêmico desses casos em determinada localidade seja conhecido, para que seja feita uma comparação entre os dados de incidência da doença no momento de ocorrência do evento investigado e o nível endêmico usualmente verificado na mesma população (BRASIL, 2009).

### 1.11 RELEVÂNCIA DA VIGILÂNCIA DA MENINGITE ASSÉPTICA

A Coordenação de Vigilância de Doenças de Transmissão Respiratória e Imunopreveníveis, da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) tem por objetivo implementar efetivamente a vigilância de meningites assépticas. Esta Coordenação divulgou recentemente a ocorrência de um surto extenso de meningite asséptica no estado da Bahia sem etiologia definida (BRASIL, 2007).

No Brasil, há poucos estudos sistemáticos sobre os agentes etiológicos envolvidos nestes casos (DOS SANTOS et al, 2006, 2011; CASTRO et al, 2009; KMETZSCH et al, 2006; PACHECO, 1999; PINTO JUNIOR et al, 2009; SILVA et al, 2002; SOARES et al, 2010).

Apesar de a meningite ser uma síndrome de notificação compulsória em todos os estados brasileiros (BRASIL, 2006), há um índice maior de casos notificados nas regiões sul e sudeste evidenciando a possibilidade de uma sub-notificação de casos nas outras regiões (norte, nordeste e centro-oeste). Sendo assim, o aumento da capacidade de diagnóstico laboratorial e a melhoria da vigilância epidemiológica em todas as regiões do País são importantes sob o ponto de vista da vigilância em saúde como um todo, por levar à obtenção de dados reais sobre a incidência da meningite asséptica e de seus agentes etiológicos. Isto possibilita um acompanhamento médico mais adequado e a elaboração de estratégias de monitoramento e redução da transmissão do agente etiológico, colaborando com a recuperação e promoção da saúde da população susceptível.

Nos últimos anos, o Laboratório de Enterovírus (LEV) realizou alguns estudos de incidência e circulação dos diferentes agentes etiológicos no Brasil (DOS SANTOS et al, 2006, 2011; KMETZSCH et al, 2006), que colaboram com o entendimento da epidemiologia da meningite asséptica.

Mesmo com o uso de metodologias moleculares de diagnóstico, o que propiciou um aumento significativo na identificação de muitos agentes envolvidos nas meningites assépticas, o percentual de casos com etiologia indeterminada é ainda considerável (DOS SANTOS et al, 2006; KING et al, 2007; PACHECO, 1999). Além disso, é possível que, em se tratando de uma síndrome com múltiplas possíveis etiologias, existam outros agentes virais nessas amostras que não foram pesquisados.

Alguns flavivírus como WNV e SLEV podem ser agentes etiológicos de meningite asséptica e meningoencefalites. No Brasil já há a descrição de casos de meningoencefalite por SLEV (MORAES BRONZONI et al, 2005). No entanto, o pequeno número de pesquisas

direcionadas a estes agentes virais e a semelhança entre os sintomas da infecção por SLEV e os da dengue levam a subestimação dos dados a respeito destes casos (BURKE; MONATH, 2001; CHADWICK, 2005; JONES et al, 2002).

Na Colômbia, em 2005, testes sorológicos apresentaram positividade para WNV em equinos (MATTAR et al, 2005). Na Argentina, WNV foi isolado de equinos sintomáticos (MORALES et al, 2006) e anticorpos anti-WNV foram detectados em aves (ADRIÁN DIAZ et al 2008). Na Venezuela também já houve identificação de soropositividade para WNV em aves e equinos (BOSCH et al, 2007).

No Brasil, ainda não há nenhum relato da circulação de WNV em humanos. Porém, essa possibilidade existe, devido a sua rápida dispersão no continente americano, às condições ambientais favoráveis e à existência de rotas de aves migratórias entre o Brasil e países onde já há descrição de WNV (CHÁVEZ; FIGUEIREDO, 2006; FIGUEIREDO, 2007). Recentemente foi reportada a detecção de anticorpos neutralizantes para este vírus em soros de equinos do pantanal brasileiro, o que seria uma evidência sorológica de sua presença em território nacional (PAUVOLID-CORRÊA et al, 2011).

O desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular que detectem de modo rápido e simples o genoma de flavivírus é de extrema utilidade para o estabelecimento de uma vigilância ativa de casos, principalmente quando se trata da possibilidade de entrada e circulação de um novo vírus no país.

Em algumas localidades dos Estados Unidos, atualmente, a orientação é a pesquisa sorológica para WNV em todos os casos de meningite asséptica com manifestações clínicas inespecíficas, para a manutenção da vigilância da circulação desse vírus (JULIAN et al, 2003).

Em países em que se desconhece a circulação em humanos de WNV, como o Brasil, deve-se programar sistemas de vigilância capazes de detectar o mais rápido possível a circulação viral em determinada área, caso ela ocorra (BRASIL, 2009).

A motivação e justificativa para o desenvolvimento deste estudo inserem-se exatamente neste contexto, onde há dúvidas em relação à negatividade das amostras e à possibilidade de presença de outros agentes etiológicos, como os flavivírus. Com a tentativa de detecção de diversos agentes potenciais numa mesma amostra, será possível ampliar o diagnóstico da meningite asséptica.

Não há, na literatura, relatos de detecção e identificação que contemplem diferentes agentes etiológicos potenciais em amostras de LCRs provenientes de casos clínicos de meningite asséptica nas quais não houve isolamento viral em culturas celulares.

Além de visar à determinação da etiologia de casos de meningite asséptica e meningoencefalite através de um diagnóstico mais amplo e mais rápido, o presente estudo analisou a variabilidade genética de E30 envolvidos em surtos e casos esporádicos dessas doenças. E30 é descrito, no Brasil, como o principal agente etiológico de casos de meningite asséptica de etiologia viral (DOS SANTOS et al, 2006).

Alguns estudos reportaram a análise filogenética do gene que codifica para a proteína VP1 de E30 (CABRERIZO et al, 2008; KE et al, 2011; LEITCH et al, 2009; LÉVÊQUE et al, 2010). A aplicação dessa técnica permite o rastreamento de relações genéticas entre as cepas virais circulantes (ISHIKO et al, 2002; PAGE; HOLMES, 1998). Considerando o potencial epidêmico de E30, fica evidenciada a importância do conhecimento, no âmbito do Brasil, da diversidade genética deste vírus.

Os objetivos deste estudo convergem com os desafios citados pela Secretaria de Vigilância em Saúde para a Vigilância das Meningites Assépticas, como implantar efetivamente essa vigilância, atuar oportunamente no controle das situações de surto e identificar os agentes etiológicos responsáveis pelos surtos no Brasil.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo geral o aprimoramento do diagnóstico laboratorial dos casos de meningite asséptica e meningoencefalite ocorridos no Brasil, com ênfase para os enterovírus e flavivírus, e a análise da variabilidade genética do principal agente viral envolvido nestes casos, E30, por análise filogenética do gene completo da proteína VP1.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar o genoma de enterovírus por PCR, após extração de RNA e síntese do cDNA, em LCRs recebidos pelo Laboratório de Enterovírus entre 2008 e 2009, provenientes de casos clínicos de meningite asséptica e meningoencefalite, nos quais não houve isolamento viral em cultura de células RD e HEp2;
- Confirmar, por sequenciamento nucleotídico, as amostras que tiveram enterovírus detectados;
- Detectar o genoma de flavivírus por *Semi-Nested-PCR* e por PCR convencional, nas amostras de LCR acima descritas, negativas quanto à presença de enterovírus;
- Confirmar, por sequenciamento nucleotídico, as amostras suspeitas de serem flavivírus;
- Analisar as características epidemiológicas dos pacientes, tais como estado de origem, faixa etária e sexo, a partir das fichas que chegaram junto com as amostras clínicas;
  
- Analisar a incidência de E30 envolvidos em surtos e casos esporádicos de meningite asséptica ocorridos no Brasil entre dezembro de 1998 e dezembro de 2008;
- Caracterizar os E30 isolados por sequenciamento nucleotídico do gene completo que codifica para a proteína VP1; e
- Estudar, por análise filogenética, a variabilidade genética dos E30 isolados em surtos e em casos esporádicos, evidenciando suas possíveis relações e/ou diferenças e realizando comparações com sequências disponíveis no *GenBank*.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DETECÇÃO DE AGENTES ETIOLÓGICOS VIRAIS

##### 3.1.1 Amostras clínicas

As 267 amostras clínicas utilizadas neste estudo são LCRs provenientes de pacientes de várias localidades do Brasil com diagnóstico clínico de meningite ou meningoencefalite com suspeita de etiologia viral, entre os anos de 2008 e 2009. Esses LCRs foram previamente testados no LEV quanto à presença de enterovírus por isolamento viral em cultura de células RD e HEp2, apresentando resultados negativos. A **FIGURA 06** esquematiza a metodologia envolvida.

As amostras clínicas foram manipuladas em conformidade com as Boas Práticas de Laboratório e os experimentos foram realizados de acordo com a Norma ABNT NBR NM ISO 15189:2008, que regula os requisitos de qualidade e competência aplicáveis ao serviço que o LEV realiza, por ser Centro Nacional de Referência para Enterovirose.

##### 3.1.1.1 Critérios para inclusão e exclusão das amostras de LCR

Alguns critérios para inclusão e exclusão das amostras foram utilizados:

- As amostras de LCR devem conter um volume apropriado (volume mínimo estipulado de 1 ml) e ter sido coletadas durante a fase aguda da doença. Amostras recebidas em volume insuficiente para a realização dos experimentos necessários (volume < 1 ml) não foram utilizadas no estudo, uma vez que não seria possível a estocagem de material clínico remanescente para repetição posterior;
- Os LCRs utilizados neste estudo devem ter características compatíveis com meningite asséptica (>5 e < 500 células / mm<sup>3</sup>);
- As amostras devem vir acompanhadas de ficha contendo dados clínicos dos pacientes e informações quanto às análises laboratoriais previamente realizadas; e
- As amostras devem ter sido recebidas no Laboratório em tubos apropriados e em condições adequadas de refrigeração (em gelo seco ou reciclável) ou congeladas.

Inicialmente haviam sido selecionadas para o estudo todas as amostras de LCR negativas para o isolamento de enterovírus em cultura de células recebidas entre 2008 e 2009.

Esse total correspondia a 455 amostras. Após serem submetidas aos critérios de exclusão, principalmente pelo volume limitante de amostra que restou após a tentativa de isolamento, o número de amostras analisadas ficou em 267.

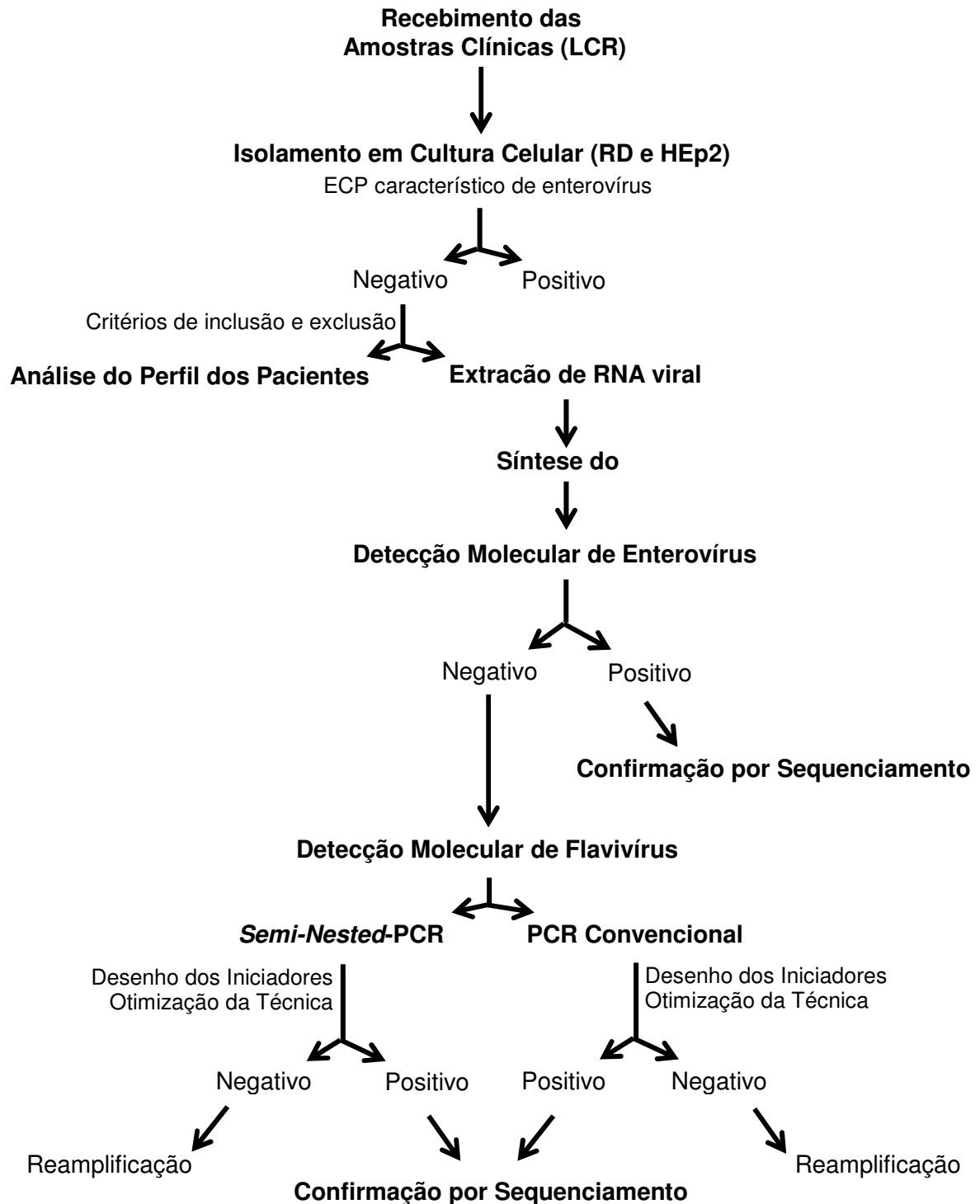
### 3.1.2 Extração de RNA viral

Os vírus RNA, como enterovírus e flavivírus, potencialmente presentes nas amostras de LCR tiveram seu RNA extraído com o uso do *Kit QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN), apropriado para purificação de RNA de fluidos corporais, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

### 3.1.3 Síntese do cDNA

O cDNA (DNA complementar) foi sintetizado utilizando o *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems*), a partir de 10 µl do RNA extraído, em termociclador GeneAmp PCR System 9700, seguindo o protocolo do fabricante.

**FIGURA 06 - Fluxograma Simplificado da Metodologia Envolvida na Detecção de Agentes Etiológicos Virais.**



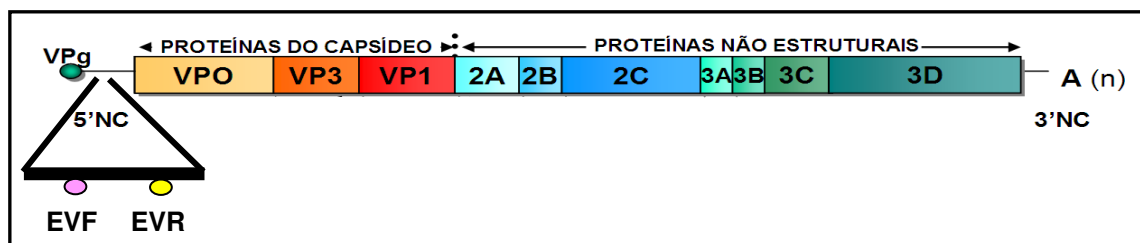
### 3.1.4 Detecção molecular de enterovírus

Para detectar os enterovírus potencialmente presentes nas amostras de LCR foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), após extração de RNA viral e síntese do cDNA.

Os iniciadores utilizados (EVR e EVF) flanqueiam a região terminal 5' não codificante (5'NC), que é uma região conservada e comum ao genoma de todos os enterovírus humanos conhecidos. O tamanho do fragmento amplificado esperado é de 153 pb (**FIGURA 07**).

A sequência do iniciador EVR (R - *Reverse*) é: 5'- ATT GTC ACC ATA AGC AGC C -3'. Já a sequência do iniciador EVF (F - *Forward*) é: 5'- CTC CGG CCC CTG AAT GCG GCT A -3'. Este par de iniciadores é utilizado na rotina de diagnóstico do Laboratório de Enterovírus.

**FIGURA 07 – Local de Hibridização dos Iniciadores EVR e EVF no Genoma dos Enterovírus.**



Fonte: Adaptado de Costa, 1999.

Para a PCR, 4 µl do cDNA foram aliqüotados em um tubo apropriado contendo 50 µM do iniciador EVR, 50 µM do iniciador EVF, 12,5 µl de GoTaq *Green Master Mix* (Promega), que contém Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, solução tampão e o *Loading buffer*, e água deionizada autoclavada para um volume final de reação de 25 µl. A reação de PCR foi realizada com uma etapa prévia de desnaturação de 3 min / 95°C e 35 ciclos de 45 seg / 95°C, 45 seg / 55°C e 45 seg / 70°C com uma extensão final de 7 min / 70°C em termociclador GeneAmp PCR System 9700.

As reações de PCR foram acompanhadas por um controle positivo e um controle negativo. Para isso, foram utilizados os mesmos reagentes e enzimas para as amostras e para os controles. Amostras de cDNA conhecidamente positivos para enterovírus foram usados como controles positivos das reações e água estéril foi usada como controle negativo. Este acompanhamento com os Controles foi feito para verificar tanto a eficiência da reação, ou seja, se todos os reagentes estavam em condições de uso (Controle Positivo), quanto para verificar se houve contaminação na manipulação das amostras ou dos reagentes (Controle Negativo).

A manipulação das amostras e o preparo das misturas de reagentes utilizados na PCR foram realizados em ambientes distintos, a fim de evitar contaminação.

A visualização dos produtos amplificados na PCR foi feita por eletroforese em gel de acrilamida 10%. Como referência de tamanho molecular foi utilizado o marcador 50 bp (Invitrogen). A eletroforese foi procedida a 130 Volts em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5X por 50-60 minutos e em seguida o gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5 mg/ml. Os produtos amplificados foram visualizados e digitalizados em um sistema de fotodocumentação com luz UV Universal Hood II (BioRad).

#### 3.1.4.1 *Confirmação da detecção de enterovírus por sequenciamento nucleotídico*

As amostras positivas na pesquisa de enterovírus por PCR foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico parcial da região 5'NC para confirmação da presença de enterovírus.

Para tanto, foram utilizados os cDNAs previamente obtidos (item 3.1.3). A PCR com o par de iniciadores EVR e EVF foi realizada como descrito no item 3.1.4 Os produtos amplificados (153 pb) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%. A eluição desses produtos e a quantificação da concentração de DNA foram realizadas como descrito nos itens 3.2.3.4 e 3.2.3.5.

As reações de *cycle-sequencing* (item 3.2.3.6) foram realizadas utilizando os iniciadores EVR e EVF separadamente. A análise das sequências nucleotídicas para confirmação da identidade viral foi através da comparação com o banco de dados contido no *GenBank* através do programa BLASTn (ALTSCHUL et al, 1990).

### 3.1.5 Detecção molecular de flavivírus

As técnicas de *Semi-Nested-PCR* e PCR convencional foram desenvolvidas e utilizadas para detectar os flavivírus potencialmente presentes nas 208 amostras de LCR negativas quanto à presença de enterovírus.

#### 3.1.5.1 Desenho dos iniciadores e otimização da *Semi-Nested-PCR* para detecção de flavivírus

As seqüências dos iniciadores F1, F2 e R1 foram definidas a partir da análise do alinhamento múltiplo de seqüências do gene NS5 de alguns flavivírus, como WNV, JEV, SLEV, YFV e DENV1 a 4, através do programa Bio-Edit 7.0.9 (HALL, 1999). Este gene codifica para a proteína NS5 e é altamente conservado entre os flavivírus.

As seqüências dos iniciadores, bem como suas orientações, tamanhos dos fragmentos por eles amplificados e posições de hibridização no genoma viral encontram-se na **TABELA 04**.

**TABELA 04 - Iniciadores Usados na *Semi-Nested-PCR* e na PCR Convencional para Detecção de Flavivírus.**

Iniciadores	Orientação	Seqüências (5'→3') <sup>a</sup>	Tamanho do Amplicom (pb)	Posição	Estratégia Utilizada
F1	Senso	ACA TGA TGG GRA AAM GWG AGA	258	9142-9162 <sup>b</sup>	<i>Semi-Nested</i>
R1	Antisenso	TCC CAI CCG GCK GTG TCA TC		9400-9381 <sup>b</sup>	<i>Semi-Nested</i>
R1	Antisenso	TCC CAI CCG GCK GTG TCA TC	199	9400-9381 <sup>b</sup>	<i>Semi-Nested</i>
F2	Senso	GCC ATW TGG TWC ATG TGG		9200-9217 <sup>b</sup>	<i>Semi-Nested</i>
FlaPCRF	Senso	ATG ACI GAC ACI ACI CC	56	8833-8849 <sup>c</sup>	Convencional
FlaPCRR	Antisenso	GTR TCM ACY TTY TCY TT		8888-8872 <sup>c</sup>	Convencional

<sup>a</sup> - R= A/G; M=A/C; W=A/T; I=A/C/G/T; K=G/T; Y=C/T (Código IUPAC de bases degeneradas)

<sup>b</sup> - Numeração referente ao genoma de WNV

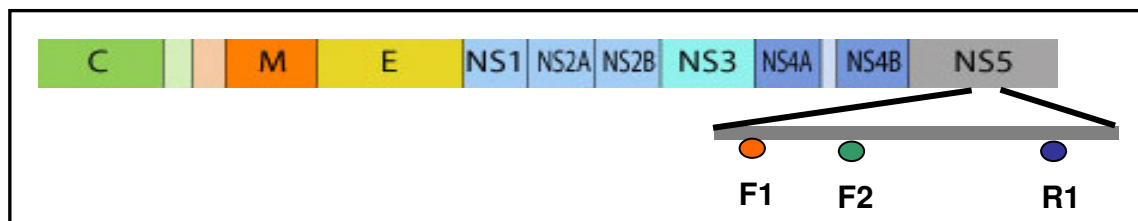
<sup>c</sup> - Numeração referente ao genoma de JEV

A otimização desta técnica envolveu tentativas de amplificação em diferentes condições, sendo testados gradientes de temperaturas de anelamento dos iniciadores (52°C a 56°C), número de ciclos (30 a 35) e diferentes concentrações dos iniciadores (15 a 150 µM). Nestes testes foram utilizadas amostras de flavivírus DENV-1, DENV-2, YFV, gentilmente cedidas pela Dra. Rita Nogueira, do Laboratório de Flavivírus (IOC / FIOCRUZ) e cDNA de WNV, cedido pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC). Elas foram utilizadas como controles positivos das reações de amplificação.

### 3.1.5.2 *Semi-Nested-PCR para detecção de flavivírus*

Os iniciadores utilizados na primeira reação (externos) foram F1 e R1. Eles flanqueiam um fragmento de 258 pb. Na segunda reação (*Semi-Nested-PCR*) foram utilizados os iniciadores F2 (interno) e R1. O tamanho do fragmento amplificado esperado com o uso desse par de iniciadores é de 199 pb (**FIGURA 08**).

**FIGURA 08 – Local de Hibridização dos Iniciadores F1, F2 e R1 no Genoma dos Flavivírus.**



Fonte: Adaptado de *Expasy Home Page* (acesso em 10/11/10).

Na primeira reação de amplificação (1º Round) adicionou-se 3 µl do cDNA obtido após extração do RNA viral do LCR (itens 3.1.2 e 3.1.3) em um volume final de 25µl contendo: 15 µM do iniciador F1, 15 µM do iniciador R1, 12,5 µl de *GoTaq Green Master Mix* (Promega) e água destilada e livre de DNAses (Gibco). A reação de PCR foi realizada com uma etapa prévia de 3 min / 95°C e 35 ciclos de 30 seg / 95°C, 45 seg / 52°C e 1 min / 70°C com uma extensão final de 7 min / 70°C em termociclador *GeneAmp PCR System 9700*.

Após a primeira reação de amplificação, 2µl do produto amplificado foram adicionados a uma mistura contendo 15 µM do iniciador F2, 15 µM do iniciador R1, 12,5 µl de GoTaq *Green Master Mix* (Promega) e água para um volume final de 25 µl. Nesta *Semi-Nested-PCR* foi utilizado o mesmo ciclo descrito para a primeira amplificação. As reações foram acompanhadas por controles positivo e negativo.

Para evitar contaminação, o preparo das misturas de reagentes utilizados nas reações de amplificação e a manipulação das amostras e do controle positivo foram feitos em ambientes distintos.

Para visualização dos produtos amplificados na *Semi-Nested-PCR*, foi procedida eletroforese em gel de acrilamida 10%, utilizando o marcador de tamanho molecular 50 bp (Invitrogen) como referência. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio 0,5 mg/ml. Os produtos amplificados foram visualizados e digitalizados em um sistema de fotodocumentação com luz UV Universal Hood II (BioRad).

As amostras foram submetidas a tentativas de reamplificação, utilizando 1µl dos produtos amplificados no segundo *round*, em novas reações de PCR, com o uso dos mesmos iniciadores (F2 e R1) e nas mesmas condições das primeiras reações.

### 3.1.5.3 *Desenho dos iniciadores e otimização da PCR convencional para detecção de flavivírus*

As sequências dos iniciadores FlaPCRF e FlaPCRR foram definidas a partir da análise do alinhamento múltiplo de sequências do gene NS5 de alguns flavivírus, como WNV, JEV, SLEV, DENV1 a 4, YFV, ILHV, ROCV e BUSV, através do programa Bio-Edit 7.0.9 (HALL, 1999). As sequências e outras informações sobre os iniciadores encontram-se na **TABELA 04**.

A otimização desta técnica envolveu tentativas de amplificação em diferentes condições, sendo testados gradientes de temperaturas de anelamento dos iniciadores (42°C a 56°C), número de ciclos (30 a 35) e diferentes concentrações dos iniciadores (15 a 150 µM). Nestes testes foram utilizadas amostras de flavivírus. Elas foram utilizadas como controles positivos das reações de amplificação.

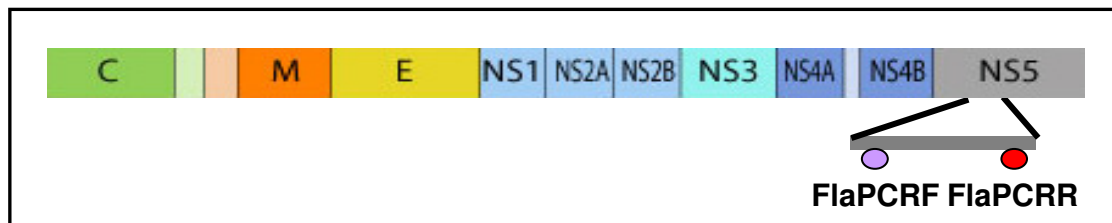


#### 3.1.5.4 PCR convencional para detecção de flavivírus

Os iniciadores utilizados para a PCR convencional foram FlaPCRF e FlaPCRR (TABELA 04 e FIGURA 09), que flanqueiam um fragmento de 56 pb.

Para a reação de amplificação adicionou-se 3 µl do cDNA obtido após extração do RNA viral do LCR (itens 3.1.2 e 3.1.3) em um volume final de 25µl contendo: 25 µM do iniciador FlaPCRF, 25 µM do iniciador FlaPCRR, 12,5 µl de GoTaq *Green Master Mix* (Promega) e água destilada e livre de DNAses (Gibco). A reação de PCR foi realizada com uma etapa prévia de 3 min / 95°C e 34 ciclos de 30 seg / 95°C, 45 seg / 42°C e 55' seg / 70°C com uma extensão final de 7 min / 70°C em termociclador GeneAmp PCR System 9700. As reações foram acompanhadas por controles positivo e negativo.

**FIGURA 09 – Local de Hibridização dos Iniciadores FlaPCRF e FlaPCRR no Genoma dos Flavivírus.**



Fonte: Adaptado de *Expasy Home Page* (acesso em 10/11/10).

Para visualização dos produtos amplificados na PCR convencional, foi procedida Eletroforese em gel de acrilamida, conforme descrito no item 3.1.5.2.

As amostras foram submetidas a tentativas de reamplificação, utilizando 1µl dos produtos amplificados, em novas reações de PCR, com o uso dos mesmos iniciadores (FlaPCRR e FlaPCRF) e nas mesmas condições das primeiras reações.

### 3.1.5.5 Confirmação da detecção de flavivírus por sequenciamento nucleotídico

As amostras positivas na pesquisa de flavivírus por *Semi-Nested-PCR* e por PCR convencional foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico parcial do gene NS5 para confirmação da presença de flavivírus.

Para tanto, foram utilizados os cDNAs previamente obtidos (item 3.1.3). A *Semi-Nested-PCR* e a PCR convencional foram realizadas como descrito nos itens 3.1.5.2 e 3.1.5.4. Os produtos amplificados no segundo round da *Semi-Nested-PCR* (199 pb) e os produtos amplificados na PCR convencional (56 pb) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%. A eluição desses produtos e a quantificação da concentração de DNA foram realizadas como descrito nos itens 3.2.3.4 e 3.2.3.5.

As reações de *cycle-sequencing* (item 3.2.3.6) foram realizadas utilizando os iniciadores F2 e R1, da *Semi-Nested-PCR*, e os iniciadores FlaPCRf e FlaPCRr, da PCR convencional, separadamente. A análise das sequências nucleotídicas para confirmação da identidade viral foi através da comparação com o banco de dados contido no *GenBank* através do programa BLASTn (ALTSCHUL et al, 1990).

### 3.1.6 Análise do perfil dos pacientes

Alguns aspectos de relevância epidemiológica dos pacientes como Estado de origem, faixa etária e sexo, foram analisados a partir das fichas que chegaram ao Laboratório de Enterovírus, recebidas com as amostras clínicas entre os anos de 2008 e 2009. Foram estabelecidas as seguintes faixas etárias: < 1 ano, 1 - 6 anos, 7 - 12 anos, 13 - 17 anos, 18 - 30 anos, 31-45 anos e > 46 anos.

## 3.2 ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ECHOVÍRUS 30

### 3.2.1 Amostras clínicas

As 48 amostras clínicas utilizadas nesse estudo são LCRs provenientes de pacientes apresentando quadros de meningite asséptica e meningoencefalite ocorridos entre dezembro de 1998 e dezembro de 2008. Entre essas amostras, 33 eram representativas dos surtos de E30

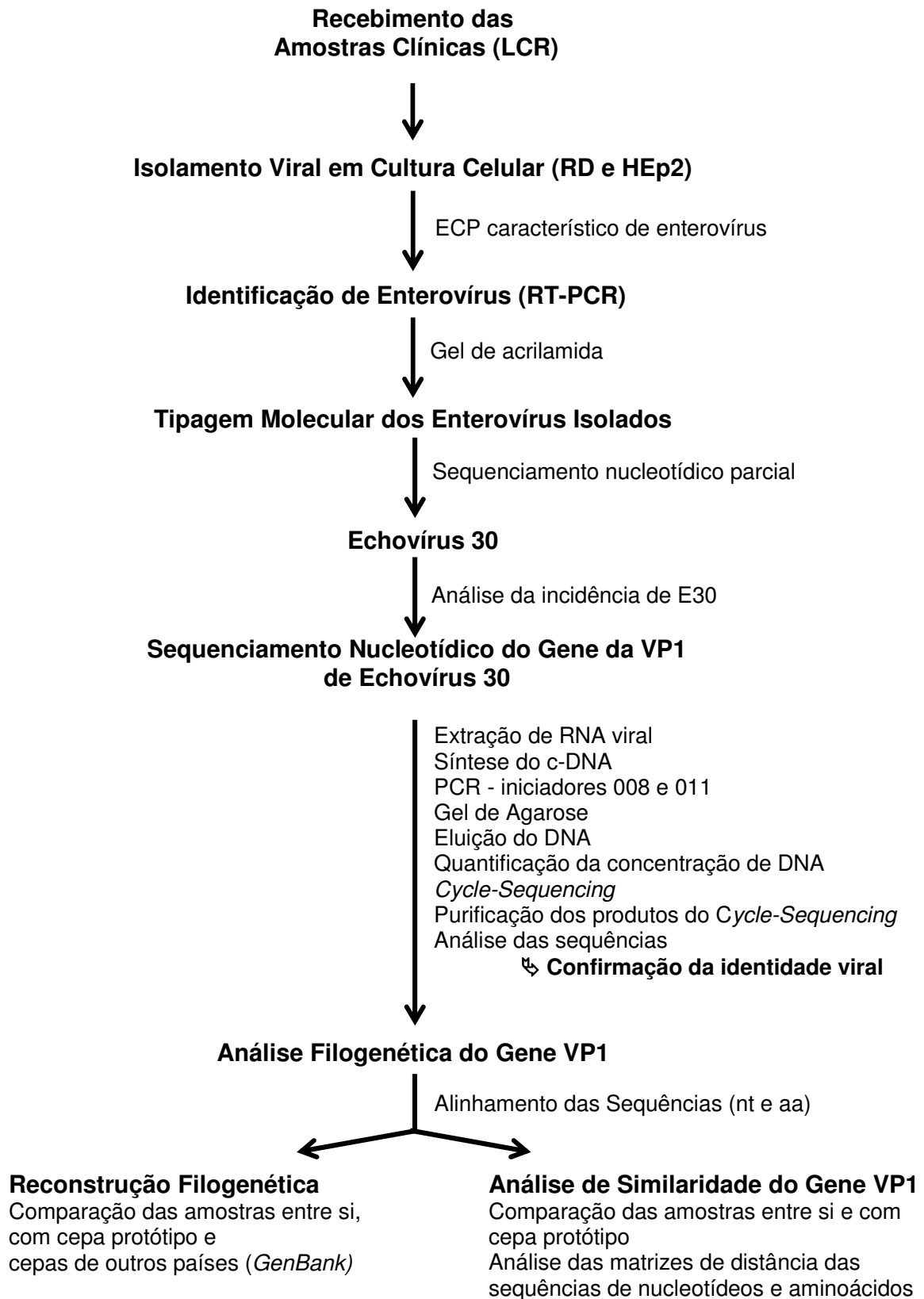
e 15 eram de casos esporádicos de E30 distribuídos ao longo do período. A **TABELA 06** detalha informações destas amostras selecionadas. A **FIGURA 10** esquematiza a metodologia envolvida.

### 3.2.2 Incidência de E30

A avaliação da incidência de E30 nas amostras de LCRs provenientes de casos de meningite asséptica e meningoencefalite, recebidas pelo LEV durante o período do estudo foi realizada baseada no quantitativo de amostras que cumpriram os seguintes critérios:

- Presença de efeito citopático característico de enterovírus em cultura de células RD e/ou HEp2;
- Resultado positivo na pesquisa de enterovírus por RT-PCR; e
- Identificação de E30 por sequenciamento nucleotídico parcial.

**FIGURA 10 - Fluxograma Simplificado da Metodologia Envolvida no Estudo da Variabilidade Genética de Echovírus 30.**



### 3.2.3 Sequenciamento nucleotídico do gene completo da VP1 de E30

Para analisar a variabilidade genética e as possíveis relações entre os E30 isolados, foi realizado o sequenciamento nucleotídico e análise filogenética do gene que codifica para a proteína VP1 (876 nt) destas amostras virais.

#### 3.2.3.1 *Extração de RNA viral*

As amostras virais positivas para o gênero *Enterovirus*, com o uso dos iniciadores grupo-específicos (EVR e EVF), foram submetidas à extração de RNA com o uso do reagente Trizol LS (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante.

#### 3.2.3.2 *Síntese do cDNA*

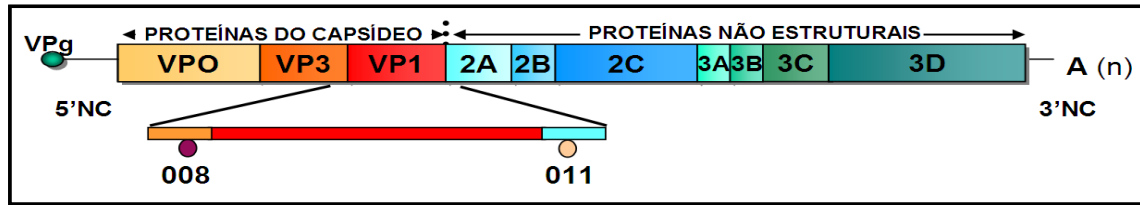
A síntese da fita de cDNA a partir do RNA extraído foi realizada utilizando o *Kit SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante.

#### 3.2.3.3 *PCR para E30*

A reação de PCR foi realizada conforme descrito por OBERSTE e colaboradores (1999): adiciona-se 3 µl de cDNA a uma mistura composta de 50 µM de cada iniciador - 011 e 008 (R e F, respectivamente), 25 µl de GoTaq *Green Master Mix* (Promega) e água deionizada autoclavada para um volume final de 50 µl. A reação de PCR foi realizada com uma etapa prévia de 2 min / 95°C e 32 ciclos de 45 seg / 95°C, 45 seg / 47°C e 2 min / 70°C com uma extensão final de 7 min / 70°C em termociclador GeneAmp PCR System 9700.

A sequência do iniciador 011 (R) é 5'- GCI CCI GAY TGI TGI CCR AA -3'. A posição em que ele se complementa ao genoma, na região do gene que codifica para a proteína 2A, é entre os nucleotídeos 3408 - 3389 (numeração baseada na cepa padrão de Poliovirus 1 Mahoney). E a sequência do iniciador 008 (F) é 5'- GCR TGC AAT GAY TTC TCW GT -3' (nt 2411 - 2430, na região de VP3). Eles amplificam um fragmento de 960 pb, incluindo todo o gene que codifica para a VP1 (**FIGURA 11**).

**FIGURA 11 – Local de Hibridização dos Iniciadores 011 (R) e 008 (F) no Genoma dos Enterovírus.**



Fonte: Adaptado de Costa, 1999.

As reações de PCR foram acompanhadas por um controle positivo e um controle negativo. Para evitar contaminação, a manipulação das amostras e o preparo dos reagentes utilizados na PCR foram realizados em ambientes distintos.

Para visualização dos produtos da PCR, as amostras (50 µl), foram acrescidas de 8,2 µl de *Loading buffer 6X* e aplicadas em gel de agarose 1%, em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X, contendo brometo de etídio 0,5 mg/ml, utilizando marcador de tamanho molecular 50 bp (Invitrogen) como referência. A eletroforese foi procedida a 130 Volts em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X por 50-60 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados e digitalizados em um sistema de foto-documentação com luz UV Universal Hood II (BioRad) e as bandas presentes na altura esperada foram cortadas e retiradas do gel de agarose para eluição do DNA.

#### 3.2.3.4 Eluição do DNA

Os produtos da PCR compatíveis com o tamanho esperado (960 pb) foram eluídos do gel de agarose e purificados com o uso do *Kit QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

#### 3.2.3.5 Quantificação da concentração de DNA

Os produtos de PCR eluídos do gel foram quantificados através da comparação, em gel de agarose 1%, com um marcador de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Foram utilizados para essa quantificação 4 µl do DNA adicionados de 2 µl de

*Loading buffer* 6X e 6 µl de água deionizada autoclavada. As amostras foram aplicadas no gel contendo brometo de etídio 0,1 µg/ml e os produtos foram visualizados e digitalizados em um sistema de foto-documentação com luz UV Universal Hood II (BioRad).

### 3.2.3.6 Reações cíclicas de sequenciamento (*cycle-sequencing*)

As concentrações de DNA utilizadas nas reações de *cycle-sequencing* foram de 100 ng/µl de DNA, que normalmente são suficientes para produzir eletroferogramas com leituras confiáveis das sequências. Foi utilizado o *kit* ABI *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* v3.1 (*Applied Biosystems*), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O fundamento do método de sequenciamento do *kit* utilizado é baseado na marcação com fluorescência dos dideoxynucleotídeos (ddNTPs) incorporados às cadeias de DNA com tamanhos variáveis formadas durante a reação. As reações de *cycle-sequencing* continham os seguintes componentes: 5 µM de um dos iniciadores da PCR (011 e 008, em tubos separados), 2,0 µl do tampão de sequenciamento fornecido pelo *kit*, 4,0 µl do *Big Dye Terminator*, e o DNA, na concentração aproximada de 100 ng/µl. Estas reações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700, com 25 ciclos de 15 seg / 95°C, 30 seg / 42°C e 3 min / 60°C.

As reações de *cycle-sequencing* foram realizadas utilizando os dois iniciadores separados em tubos diferentes para a posterior geração de *contigs* (sequências-consenso formadas pela sobreposição das sequências obtidas por cada um dos iniciadores para uma mesma amostra) do gene VP1 completo (876 pb) de cada amostra viral.

### 3.2.3.7 Purificação dos produtos de *cycle-sequencing*

Os produtos das reações de *cycle-sequencing* foram purificados por precipitação com álcool isopropílico. Em tubos tipo eppendorf de 1,5 ml, foram adicionados o produto da reação (20 µl) e 80 µl de álcool isopropílico 75%. O conteúdo do tubo foi brevemente agitado (em vórtex) e deixado em repouso por 15 minutos para a precipitação do produto. Em seguida, foi centrifugado, por 20 minutos a 15.700g. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 250 µl de álcool isopropílico 75%; a mistura foi rapidamente agitada e centrifugada novamente, por 5 minutos a 15.700g. O sobrenadante foi desprezado e o material foi seco a vácuo, em concentrador SVC100 *Speed-Vac* (Savant).

### 3.2.3.8 Análise das sequências (confirmação da identidade viral)

As amostras purificadas foram ressuspensas em 20 µl de tampão TSR (*Template Suppression Reagent*) (*Applied Biosystems*) e aquecidas a 95°C em termobloco por 3 minutos para desnaturação e evitar a formação de estruturas secundárias. As amostras foram imediatamente colocadas em banho de gelo até serem analisadas.

As sequências nucleotídicas obtidas nas reações de *cycle-sequencing* foram analisadas em sequenciador automático *PE 310 Genetic Analyser* e editadas, quando necessário, no programa Bio-Edit 7.0.9 (HALL, 1999). Para confirmação da identidade viral elas foram comparadas com o banco de dados contido no *GenBank* através do programa BLASTn (ALTSCHUL et al, 1990).

### 3.2.4 Análise filogenética da VP1 de E30

A obtenção de *contigs*, contendo a sequência completa do gene VP1, e a edição destes foi implementada pelo programa SeqMan Pro, incluído no Pacote DNASTar (BURLAND, 2000).

As 48 sequências determinadas neste estudo foram depositadas no *GenBank* e os respectivos números de acesso encontram-se na **TABELA 06**.

O alinhamento destas sequências nucleotídicas e aminoacídicas (deduzidas a partir das nucleotídicas) foi feito através do programa Clustal X (THOMPSON et al, 1997) e a edição desses alinhamentos, pelo programa Bio-Edit 7.0.9 (HALL, 1999).

A reconstrução filogenética das amostras de E30 isolados no Brasil entre 1998 e 2008 foi implementada com o uso do programa MEGA 4.0 (KUMAR et al, 2001) através do método *Neighbor-Joining* de reconstrução (SAITOU; NEI, 1987). O cálculo da matriz de distâncias genéticas entre as sequências nucleotídicas das amostras virais foi realizado utilizando o modelo Kimura *two-parameter* (KIMURA, 1980). A robustez das ramificações da árvore filogenética foi avaliada pela análise estatística de *Bootstrap* utilizando 1000 réplicas (FELSENSTEIN, 1985). Os métodos de inferência filogenética, os modelos de cálculo de matriz de distância genética e a análise de *Bootstrap* utilizada são parâmetros do próprio programa MEGA 4.0.

Além da comparação das amostras entre si, foi feita a comparação destas com a VP1 da cepa protótipo de Echovirus 30 (cepa Bastianni), com as cepas Frater e Giles e também



com outras 5 cepas isoladas no Brasil, provenientes do Estado do Pará. Estas eram as únicas sequências brasileiras do gene da VP1 de E30 disponíveis no *GenBank*. As amostras também foram comparadas com 54 sequências isoladas em diversos países. Seus números de acesso no *GenBank* encontram-se nas árvores filogenéticas. Para a América do Sul, somente oito sequências parciais do gene da VP1 de E30 foram encontradas no *GenBank*, todas da Argentina.

Para avaliar a similaridade do gene da VP1 dos E30 isolados entre si e em relação à cepa protótipo Bastianni foi realizada análise das matrizes de distâncias das sequências de nucleotídeos e aminoácidos.

As 48 sequências foram identificadas nas árvores filogenéticas pelo número, pela inscrição “Outbreak” ou “SC” para isolados de um dos surtos (1 a 6) ou casos esporádicos, respectivamente, pela sigla do Estado de origem e pelos dois últimos números do ano de isolamento. As sequências das cepas-protótipo e demais sequências utilizadas para comparação foram identificadas pelo número de acesso no *GenBank*, pelo código internacional do país de origem e pelos dois últimos números do ano de isolamento.

### 3.3 Aspectos éticos

Em cumprimento à legislação em vigor, visando à integridade e dignidade dos sujeitos da pesquisa, o projeto de pesquisa que originou este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IPEC / FIOCRUZ. O Parecer de Aprovação é o 19/2009 (**ANEXO A**).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DETECÇÃO DE AGENTES ETIOLÓGICOS VIRAIS

#### 4.1.1 Detecção molecular de enterovírus

Para a detecção de enterovírus em LCRs negativos para o isolamento viral em cultura de células RD e HEp2, foram procedidas extrações de RNA viral e síntese do cDNA, seguidas de reações de PCR utilizando o par de iniciadores EVR e EVF, que flanqueia um fragmento de 153 pb, da região 5'NC do genoma viral.

A extração de RNA direta do LCR seguida de síntese de cDNA e PCR foi capaz de detectar o genoma de enterovírus em 59 amostras, dos 267 LCRs analisados (22,1%). Os controles positivo e negativo utilizados nas reações apresentaram-se como esperado. Na **FIGURA 12** pode ser observado o perfil eletroforético dos produtos amplificados de algumas amostras analisadas.

**FIGURA 12 – Perfil Eletroforético dos Produtos Amplificados, por PCR, para a Detecção Molecular de Enterovírus.**



Iniciadores Utilizados - EVR e EVF (153 pb)

1 – Marcador de Tamanho Molecular 50 bp ladder

3, 8, 9 10, 11 e 12 – Amostras Positivas

14 – Controle Positivo

15 – Controle Negativo

#### 4.1.1.1 Confirmação da detecção de enterovírus por sequenciamento nucleotídico

Todas as amostras com enterovírus detectados tiveram seus resultados confirmados pelo sequenciamento nucleotídico. As sequências obtidas foram comparadas com outras depositadas no *GenBank*, sendo identificadas como sequências parciais da região 5'NC de enterovírus.

#### 4.1.2 Detecção molecular de flavivírus

##### 4.1.2.1 *Semi-Nested-PCR*

A otimização da técnica de *Semi-Nested-PCR* foi realizada variando-se parâmetros como temperaturas de anelamento dos iniciadores, número de ciclos e concentrações dos iniciadores. As condições em que houve a melhor amplificação foram: 52°C para a temperatura de anelamento dos iniciadores F1, R1 e F2, 35 ciclos e o uso da concentração de 15 µM dos iniciadores. A **FIGURA 13** ilustra o primeiro e o segundo *rounds* com a temperatura de 52°C para anelamento dos iniciadores e um gradiente de concentrações dos iniciadores. Os produtos amplificados esperados nas duas reações são, respectivamente, 258 pb e 199 pb.

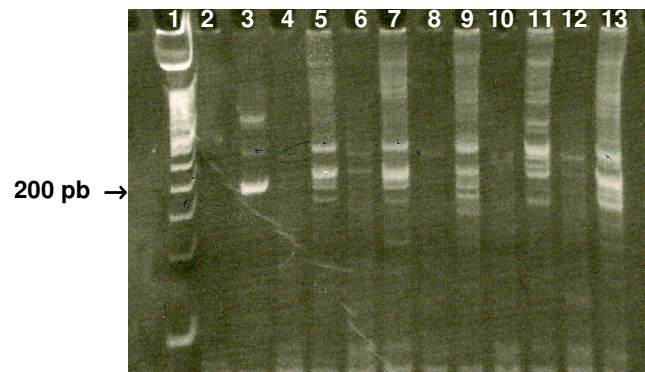
Na detecção de flavivírus por *Semi-Nested-PCR* nas 208 amostras, 199 foram negativas e nove apresentaram resultado indeterminado. Nesses casos, houve dúvidas em relação à presença e/ou à altura das bandas.

Os controles positivo e negativo utilizados nas reações apresentaram-se como esperado. O controle positivo foi amplificado consistentemente, sendo facilmente observado na eletroforese em gel de acrilamida, demonstrando que a *Semi-Nested-PCR* com os iniciadores F1, R1 e F2 é apropriada para a detecção do genoma de flavivírus.

Não houve alteração nos resultados com as tentativas de reamplificação.

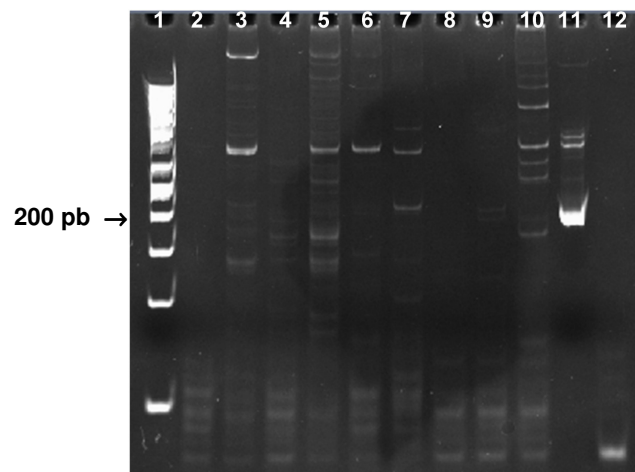
Na **FIGURA 14** pode ser observado o perfil eletroforético dos produtos amplificados de algumas amostras analisadas.

**FIGURA 13– Perfil Eletroforético dos Produtos Amplificados na Otimização da Detecção Molecular de Flavivírus por *Semi-Nested-PCR*.**



Iniciadores Utilizados na 1ª Reação – F1 e R1 (258 pb)  
 Iniciadores Utilizados na 2ª Reação – F2 e R1 (199 pb)  
 1 – Marcador de Tamanho Molecular *50 bp ladder*  
 2 e 3 - 1ª e 2ª Reações – 52°C e 15 µM dos iniciadores  
 4 e 5 - 1ª e 2ª Reações – 52°C e 25 µM dos iniciadores  
 6 e 7 - 1ª e 2ª Reações – 52°C e 40 µM  
 8 e 9 - 1ª e 2ª Reações – 52°C e 75 µM  
 10 e 11 - 1ª e 2ª Reações – 52°C e 100 µM  
 12 e 13 - 1ª e 2ª Reações – 52°C e 150 µM

**FIGURA 14 – Perfil Eletroforético dos Produtos Amplificados na *Semi-Nested-PCR*.**



Iniciadores Utilizados (2ª Reação) – F2 e R1 (199 pb)  
 1 – Marcador de Tamanho Molecular *50 bp ladder*  
 2 a 10 – Amostras Analisadas  
 11 – Controle Positivo  
 12 – Controle Negativo

#### 4.1.2.2 PCR convencional

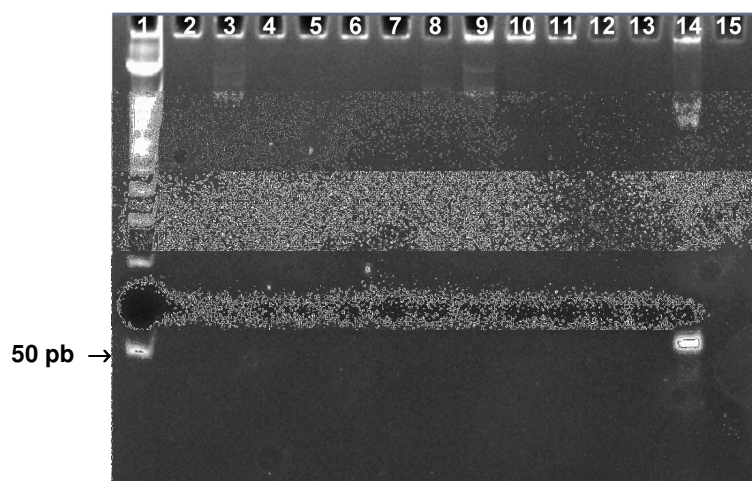
A otimização da técnica de PCR convencional foi realizada modificando-se parâmetros como temperaturas de anelamento dos iniciadores, número de ciclos e concentrações dos iniciadores. As condições em que houve a melhor amplificação foram: 42°C para a temperatura de anelamento dos iniciadores FlaPCRF e FlaPCRR, 34 ciclos e o uso da concentração de 25 µM dos iniciadores.

Na detecção de flavivírus por PCR convencional nas 208 amostras, 204 foram negativas e quatro apresentaram resultado indeterminado. Os controles positivo e negativo utilizados nas reações apresentaram-se como esperado. O controle positivo foi amplificado consistentemente, sendo facilmente observado na eletroforese em gel de acrilamida, demonstrando que a PCR convencional com os iniciadores FlaPCRF e FlaPCRR é apropriada para a detecção do genoma de flavivírus.

Não houve alteração nos resultados com as tentativas de reamplificação.

Na **FIGURA 15** pode ser observado o perfil eletroforético dos produtos amplificados de algumas amostras analisadas.

**FIGURA 15 – Perfil Eletroforético dos Produtos Amplificados na PCR Convencional.**



Iniciadores Utilizados – FlaPCRF e FlaPCRR (56 pb)  
 1 – Marcador de Tamanho Molecular 50 bp ladder  
 2 a 13 – Amostras Analisadas  
 14 – Controle Positivo  
 15 – Controle Negativo

#### 4.1.2.3 Confirmação da detecção de flavivírus por sequenciamento nucleotídico

Nenhuma das 13 amostras com resultado indeterminado na *Semi-Nested-PCR* e na PCR convencional tiveram sequências compatíveis com flavivírus, nas comparações com o *GenBank*. As sequências obtidas ou não apresentaram homologia com nenhuma outra sequência ou foram identificadas como sequências parciais de alguns genes humanos, tendo sido consideradas negativas.

#### 4.1.3 Análise do perfil dos pacientes

Entre os pacientes incluídos neste estudo (n=267), 121 (45,3 %) eram do sexo feminino e 146 (54,7 %) do sexo masculino. A distribuição dos casos por Estado, pelas faixas etárias e pelo sexo encontra-se na **TABELA 05**.

Na análise das faixas etárias, quase 10% dos pacientes ainda não haviam completado um ano de idade e 24,3% tinham entre um e seis anos. Além disso, 21 pacientes (7,9%) tinham idade superior a 46 anos. A idade dos pacientes foi, em média, de 36 anos, variando de quatro dias de vida até 72 anos. A idade de 52 pacientes (19,4%) não estava informada nas fichas.

Em relação à distribuição, por Estado, dos casos de meningite e meningoencefalite incluídos neste estudo, 35,2% dos pacientes eram provenientes da Bahia, 21% eram do Rio de Janeiro e 11,6% eram do Paraná.

**TABELA 05 - Aspectos Epidemiológicos dos Pacientes Incluídos no Estudo.**

Aspectos Analisados		Total (267) Nº (%)
<b>Sexo</b>	<b>Feminino</b>	121 (45,3%)
	<b>Masculino</b>	146 (54,7%)
<b>Faixa etária</b>	<b>&lt; 1 ano</b>	26 (9,7 %)
	<b>1 - 6 anos</b>	65 (24,3 %)
	<b>7 - 12 anos</b>	37 (13,9 %)
	<b>13 - 17 anos</b>	10 (3,7 %)
	<b>18 - 30 anos</b>	36 (13,5 %)
	<b>31 - 45 anos</b>	20 (7,5 %)
	<b>&gt; 46 anos</b>	21 (7,9 %)
	<b>Não Informada</b>	52 (19,4 %)
	<b>Estado</b>	
<b>Bahia</b>	94 (35,2%)	
<b>Distrito Federal</b>	23 (8,6%)	
<b>Minas Gerais</b>	27 (10%)	
<b>Paraná</b>	31 (11,6%)	
<b>Piauí</b>	29 (10,8%)	
<b>Rio de Janeiro</b>	56 (21%)	
<b>Santa Catarina</b>	07 (2,6%)	

#### 4.2 ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ECHOVÍRUS 30

Este estudo foi publicado no periódico *Journal of Medical Virology*, 83:2164–71 (2011) (**ANEXO B**).

##### 4.2.1 Incidência de E30

Entre dezembro de 1998 e dezembro de 2008 o Laboratório de Enterovírus recebeu 3186 amostras de LCR de casos clínicos de meningite asséptica e de meningoencefalite de várias localidades do Brasil e 302 (9,4%) destas foram identificadas como enterovírus Não-Pólio por RT-PCR. Entre estas, 177 foram identificadas por sequenciamento nucleotídico parcial como E30 (58,6% de 302) e eram provenientes de seis surtos ocorridos no Brasil durante o período do estudo, e de 51 casos esporádicos. A **TABELA 06** detalha informações

dos isolados de E30 selecionados para análise filogenética. Dados detalhados sobre região geográfica, período de duração dos surtos e as taxas de isolamento encontram-se na **TABELA 07**.

**TABELA 06 – Informações dos Isolados de Echovírus 30 Analisados.**

	Ano	Região Geográfica <sup>a</sup>	Origem Epidemiológica	% de Similaridade Nucleotídica com Cepa Bastianni (876 nt)	% de Similaridade de Aminoácidos com Cepa Bastianni (292 aa)	Número de Acesso no <i>GenBank</i>
01	1998	PR	Surto 1	83,5	92,4	HQ152879
02	1998	PR	Surto 1	83,5	92,8	HQ152880
03	1998	PR	Surto 1	83,0	91,4	HQ152881
04	1998	PR	Surto 1	83,5	92,8	HQ152882
05	1998	PR	Surto 1	83,1	91,1	HQ152883
06	1999	PR	Caso Esporádico	82,6	91,1	HQ152884
07	2001	PR	Surto 2	82,8	91,1	HQ152885
08	2001	PR	Surto 2	83,2	91,4	HQ152886
09	2001	PR	Surto 2	83,8	92,1	HQ152887
10	2001	PR	Surto 2	83,9	91,8	HQ152888
11	2001	PR	Caso Esporádico	83,5	91,4	HQ152889
12	2001	PR	Surto 3	83,3	91,4	HQ152890
13	2001	PR	Surto 3	82,9	91,1	HQ152891
14	2001	PR	Surto 3	82,8	92,1	HQ152892
15	2001	PR	Surto 3	83,5	90,7	HQ152893
16	2002	RJ	Caso Esporádico	82,7	92,4	HQ152894
17	2002	RJ	Caso Esporádico	83,4	92,8	HQ152895
18	2002	RJ	Caso Esporádico	83,0	92,1	HQ152896
19	2002	PE	Surto 4	82,6	91,4	HQ152897
20	2002	PE	Surto 4	82,8	91,8	HQ152898
21	2002	PE	Surto 4	82,6	91,8	HQ152899
22	2002	PE	Surto 4	83,0	92,1	HQ152900
23	2002	PE	Surto 4	82,7	91,8	HQ152901
24	2002	PE	Surto 4	82,8	92,1	HQ152902
25	2003	PR	Caso Esporádico	83,0	91,8	HQ152903
26	2005	RJ	Surto 5	82,6	91,8	HQ152904
27	2005	RJ	Surto 5	82,2	91,1	HQ152905
28	2005	RJ	Surto 5	82,4	91,8	HQ152906



29	2005	RJ	Surto 5	82,5	91,4	HQ152907
30	2005	RJ	Surto 5	82,6	92,5	HQ152908
31	2005	RJ	Surto 5	82,6	92,1	HQ152909
32	2005	RJ	Surto 5	82,0	91,4	HQ152910
33	2005	RJ	Surto 5	82,4	91,8	HQ152911
34	2005	PR	Caso Esporádico	82,1	91,1	HQ152912
35	2006	RS	Caso Esporádico	80,8	89,7	HQ152913
36	2006	RS	Caso Esporádico	81,3	90,7	HQ152914
37	2006	RS	Caso Esporádico	81,8	91,8	HQ152915
38	2007	DF	Caso Esporádico	82,0	90,4	HQ152916
39	2007	BA	Caso Esporádico	80,8	90,8	HQ152917
40	2007	BA	Caso Esporádico	82,5	92,1	HQ152918
41	2008	RJ	Caso Esporádico	81,2	91,4	HQ152919
42	2008	RJ	Caso Esporádico	81,0	90,4	HQ152920
43	2008	RJ	Surto 6	80,5	91,1	HQ152921
44	2008	RJ	Surto 6	80,7	90,8	HQ152922
45	2008	RJ	Surto 6	81,9	91,4	HQ152923
46	2008	RJ	Surto 6	81,7	91,1	HQ152924
47	2008	RJ	Surto 6	81,7	91,1	HQ152925
48	2008	RJ	Surto 6	81,2	91,4	HQ152926

a- Estados: BA - Bahia; DF – Distrito Federal; PE - Pernambuco; PR - Paraná; RJ – Rio de Janeiro; RS – Rio Grande do Sul.

**TABELA 07 – Características Epidemiológicas e Genéticas dos seis surtos de meningite por Echovírus 30 ocorridos no Brasil - 1998 a 2008.**

	<b>Surto 1</b>	<b>Surto 2</b>	<b>Surto 3</b>	<b>Surto 4</b>	<b>Surto 5</b>	<b>Surto 6</b>
<b>Estado</b>	Paraná	Paraná	Paraná	Pernambuco	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro
<b>Período Provável de Ocorrência</b>	Dezembro 1998 a Fevereiro 1999	Dezembro 2000 a Janeiro 2001	Outubro a Novembro 2001	Abril 2002 a Junho 2002	Março a Abril 2005	Outubro 2008
<b>Total de Amostras Analisadas (LCR)</b>	101	48	56	70	116	18
<b>Amostras Submetidas à Análise Filogenética</b>	5	4	4	6	8	6
<b>Amostras com Isolamento de E30 (Taxa de Isolamento)</b>	35 (34,6%)	15 (31,2%)	21 (37,5%)	26 (37,1%)	22 (18,9%)	7 (38,8%)
<b>Similaridade Nucleotídica entre os Isolados</b>	97,3 - 99,3%	98,0 - 99,0%	96,9 - 98,6%	98,6-99,8%	95,0-99,3%	94,5-99,4%
<b>Similaridade de Aminoácidos entre os Isolados</b>	95,5 - 99,6%	97,9 - 99,6%	96,9 - 98,2%	97,6 - 99,6%	96,2 - 100%	96,9 - 99,3%

Foram identificados seis surtos de meningite asséptica por E30 no Brasil, durante o período do estudo. Três surtos ocorreram no Estado do Paraná, o primeiro entre o fim de 1998 e o início de 1999, o segundo entre 2000-2001 e o terceiro no final do ano de 2001. A taxa de isolamento de E30 nestes surtos foi de 34,4%, em média. Desses três surtos, foram selecionados para análise filogenética cinco, quatro e quatro representantes, respectivamente.

O quarto surto ocorreu no Estado de Pernambuco, em 2002, com 37,1% de isolamento de E30. Para análise filogenética, foram selecionados seis representantes deste surto.

No Rio de Janeiro ocorreram dois surtos, em 2005 e 2008. E30 foi isolado em 18,9% e 38,8% das amostras analisadas, respectivamente. Oito representantes do surto de 2005 e seis do surto de 2008 foram selecionados para análise filogenética.

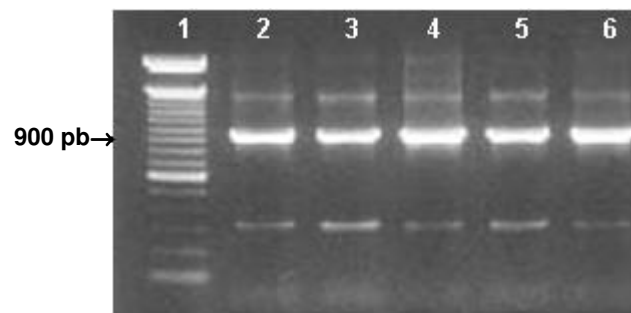
#### 4.2.2 Sequenciamento nucleotídico do gene completo da VP1 de E30

O sequenciamento nucleotídico do gene que codifica para a proteína VP1 de E30 das 48 amostras virais foi procedido como descrito na metodologia. A **FIGURA 16** ilustra o perfil eletroforético dos produtos amplificados de algumas amostras na PCR para E30.

Esses produtos foram submetidos à eletroforese, eluídos do gel de agarose e tiveram sua concentração de DNA quantificada (**FIGURA 17**).

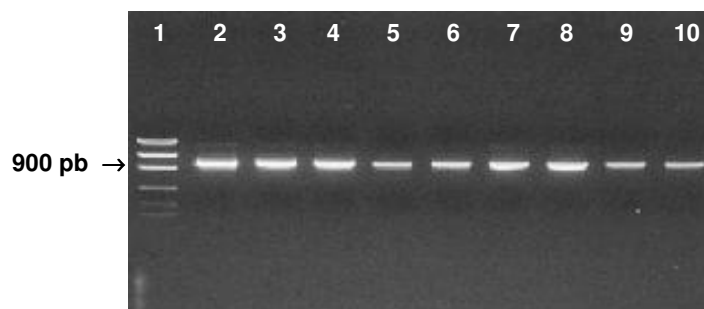
As sequências obtidas nas reações de *cycle-sequencing* com o iniciador 011 foram sobrepostas às obtidas com o iniciador 008, formando as sequências-consenso (*contigs*) da VP1 de E30. Estas foram utilizadas na análise filogenética.

**FIGURA 16 – Perfil Eletroforético dos Produtos Amplificados na PCR para E30.**



Iniciadores Utilizados – 011 e 008 (960 pb)  
 1 – Marcador de Tamanho Molecular *100 bp ladder*  
 2 a 6 – Amostras de E30 Analisadas

**FIGURA 17 – Perfil Eletroforético da Quantificação da Concentração de DNA dos Produtos Amplificados na PCR para E30 (960 pb).**

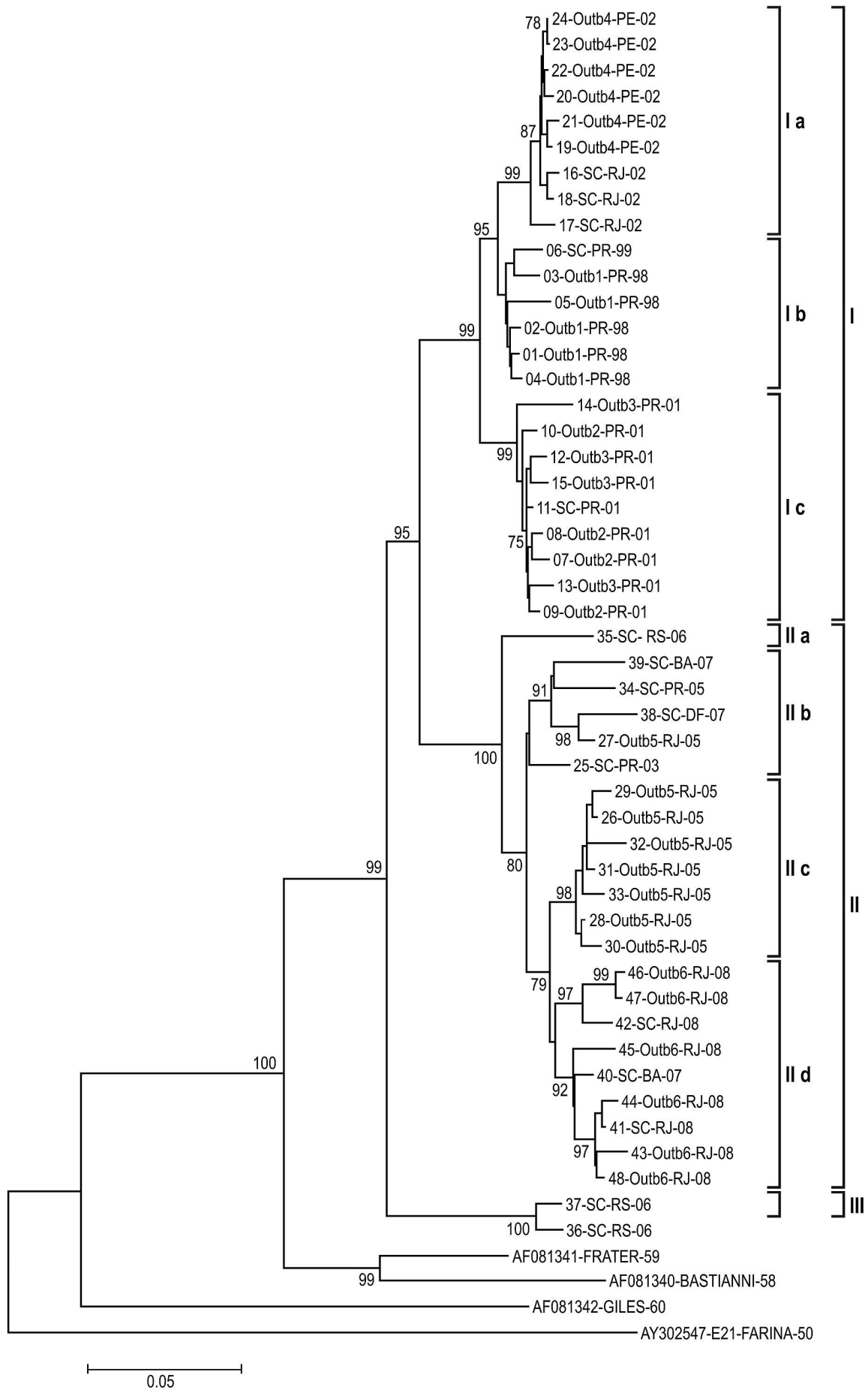


1 – Marcador de Massa Molecular *Low DNA Mass Ladder*  
 2 a 10 – Amostras de E30 Analisadas

#### 4.2.3 Análise filogenética do gene VP1 de E30

A análise filogenética de sequências completas do gene da VP1 (876 nt) mostrou que as cepas (ou isolados) de E30 se separaram em três grandes grupos distintos, I, II e III, e sete subgrupos, Ia-Ic e IIa-IId (**FIGURA 18**). O grupo I incluiu 24 sequências de cepas isoladas de quatro surtos e de casos esporádicos em 1998, 1999, 2001 e 2002. Este grupo foi geneticamente homogêneo, apresentando 0,2% a 6,1% de divergência de nucleotídeos. O grupo II foi constituído de 22 cepas de E30 isoladas em surtos e casos esporádicos ocorridos entre 2003 e 2008 (0,6 a 8,6% de divergência). O Grupo III apresentou-se como um agrupamento independente de duas sequências de E30 isolados de casos esporádicos em 2006. A cepa protótipo Bastianni (1958) e a cepa Frater (1959) se agruparam e permaneceram separadas dos demais Grupos.

**FIGURA 18 – Análise Filogenética das Sequências do Gene VP1 (876 nt) de 48 Echovírus 30 Isolados no Brasil (1998-2008).**



Em geral, a divergência das sequências de nucleotídeos, em comparações entre os isolados de E30, variou de 0,2 a 13,8%. Comparada com a cepa protótipo esta divergência genética aumentou para 16,1 a 19,5% (**TABELAS 06 e 07**). A cepa protótipo Farina de echovírus 21 foi usada como grupo externo e agrupou monofileticamente todas as sequências de E30 (67,9 a 70,1% de semelhança genética).

Exceto as cepas Bastianni e Frater, não foi definido um ancestral comum direto para o conjunto de isolados de E30 analisados neste estudo.

As cepas mais divergentes foram 36-SC-RS-06 e 37-SC-RS-06, do Grupo III. Elas diferiram de todos os outros isolados incluídos neste estudo de 10,3 a 13,8%. Além delas, o isolado 35-SC-RS-06 também não agrupou com qualquer outro isolado.

A formação dos Subgrupos dos Grupos I e II foi fortemente ligada ao ano de isolamento, principalmente quando foram observados os isolados provenientes de surtos. Isto pode ser demonstrado pelo alto relacionamento genético entre isolados do mesmo surto (**TABELA 07**) ou de casos esporádicos do mesmo ano.

As divergências de sequências nucleotídicas completas da VP1 para os isolados de 1998 e 1999 foram de apenas 0,7 - 3,0%. Em 2001, os isolados foram divergentes entre si de 0,8 a 3,6%. Em 2002, a divergência genética em sequências da VP1 variou de 0,2 a 2,6%. Em 2008, isolados divergiram de 0,6 a 5,5% entre si.

Uma cepa viral isolada de um caso esporádico em 1999 (06-SC-PR-99) e todos os isolados de um surto em 1998 foram membros de um único subgrupo do Grupo I. Todos eram do Estado do Paraná. Sequências de VP1 de E30 de 2001, 2002 e 2008, tanto de casos esporádicos quanto de surtos, ficaram agrupadas em três subgrupos respectivos dos Grupos I e II (Ic, Ia e Iid). O mesmo comportamento foi evidente nas cepas de 2005, exceto para os isolados 27-Outbreak5-RJ-05 e 34-SC-PR-05, que mostraram 3,7 - 5,9% de divergência de nucleotídeos nas comparações com outros isolados do mesmo ano.

No intervalo entre 2003 e 2004, não houve nenhum surto, e apenas ocorreu um caso esporádico (25-SC-PR-03) com E30 envolvido entre as amostras em estudo.

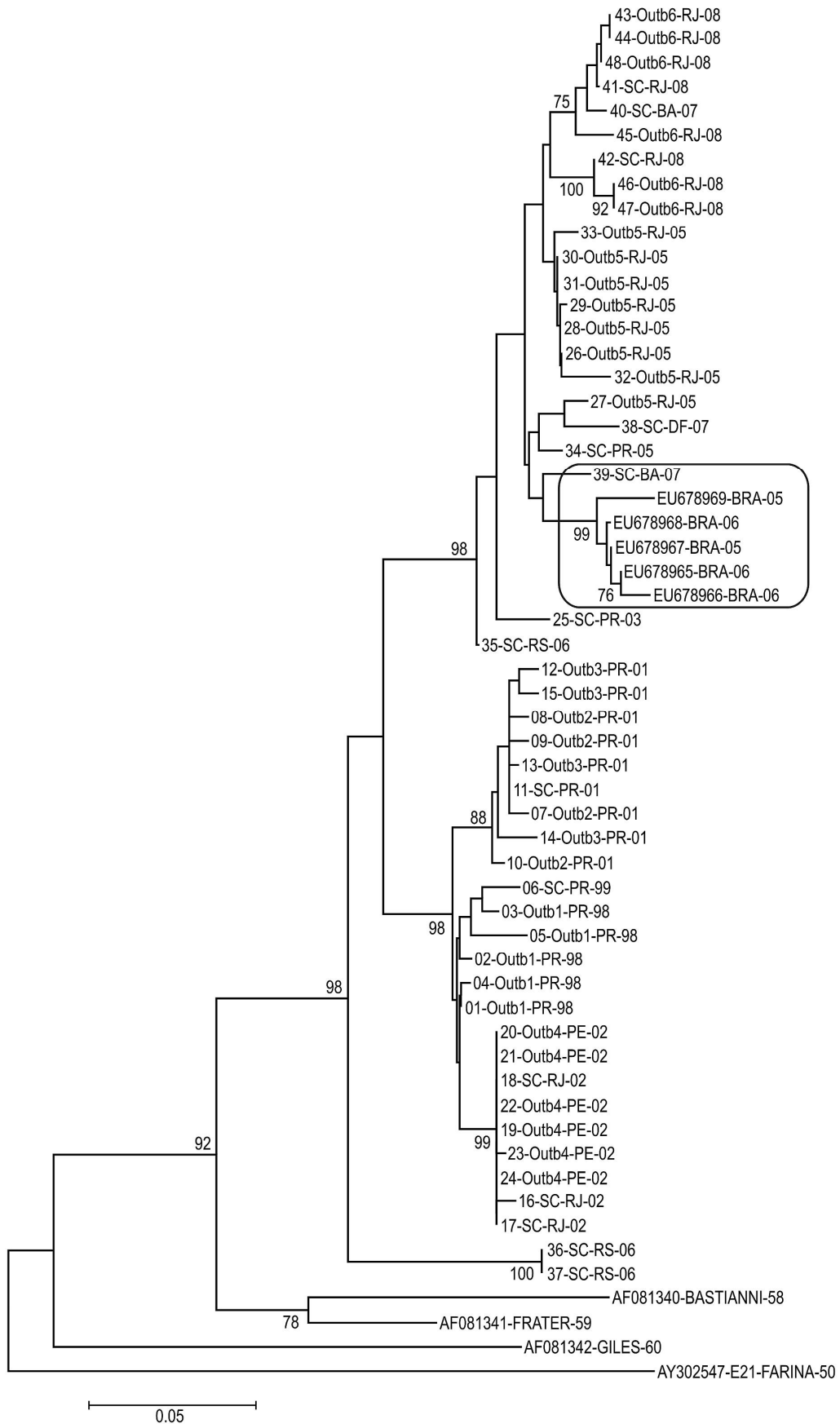
#### 4.2.3.1 *Comparação com outros E30 isolados no Brasil*

As sequências de VP1 de E30 determinadas neste estudo também foram comparadas com cinco sequências de E30 brasileiros isolados no Estado do Pará em 2005 e 2006. Essa comparação foi feita com sequências parciais do gene VP1 (349 nt), devido ao tamanho das

sequências do Pará, que eram menores que as sequências obtidas neste estudo (**FIGURA 19**).

O isolado 39-SC-BA-07, uma cepa de 2007 de um caso esporádico da Bahia, foi geneticamente relacionado com as cepas de E30 do Pará (apenas 3,2 - 4,6% de divergência de sequência de nucleotídeos). Essas cepas virais agruparam no Grupo II, que contém as cepas mais recentes isoladas neste estudo.

**FIGURA 19 – Análise Filogenética das Sequências Parciais do Gene VP1 (349 nt) dos 48 Echovírus 30 Isolados no Brasil e de Cinco Sequências do Estado do Pará.**





#### 4.2.3.2 Comparação com E30 isolados em outros países

A análise filogenética incluiu também comparações entre 23 representantes dos Grupos I, II e III e 46 sequências da VP1 de E30 circulantes entre 1994 e 2008 nos seguintes países: Alemanha, Austrália, Áustria, Barein, Belarus, Bélgica, China, Colômbia, Dinamarca, Estados Unidos, Finlândia, França, Holanda, Israel, Itália, Jamaica, Japão, Malásia, Moldávia, Polônia, Rússia, Suécia, Taiwan, Ucrânia e Uzbequistão (**FIGURA 20**).

Na América do Sul, as comparações foram realizadas separadamente dos outros países, com oito sequências parciais da VP1 de E30 isolados na Argentina, que tinham 420 nucleotídeos.

Informações sobre a origem geográfica, ano de isolamento e o número de acesso destas sequências de E30 selecionadas no *GenBank* estão nas árvores filogenéticas.

Quando comparadas com sequências de outros países, os Grupos I, II e III permaneceram formando grupos monofiléticos.

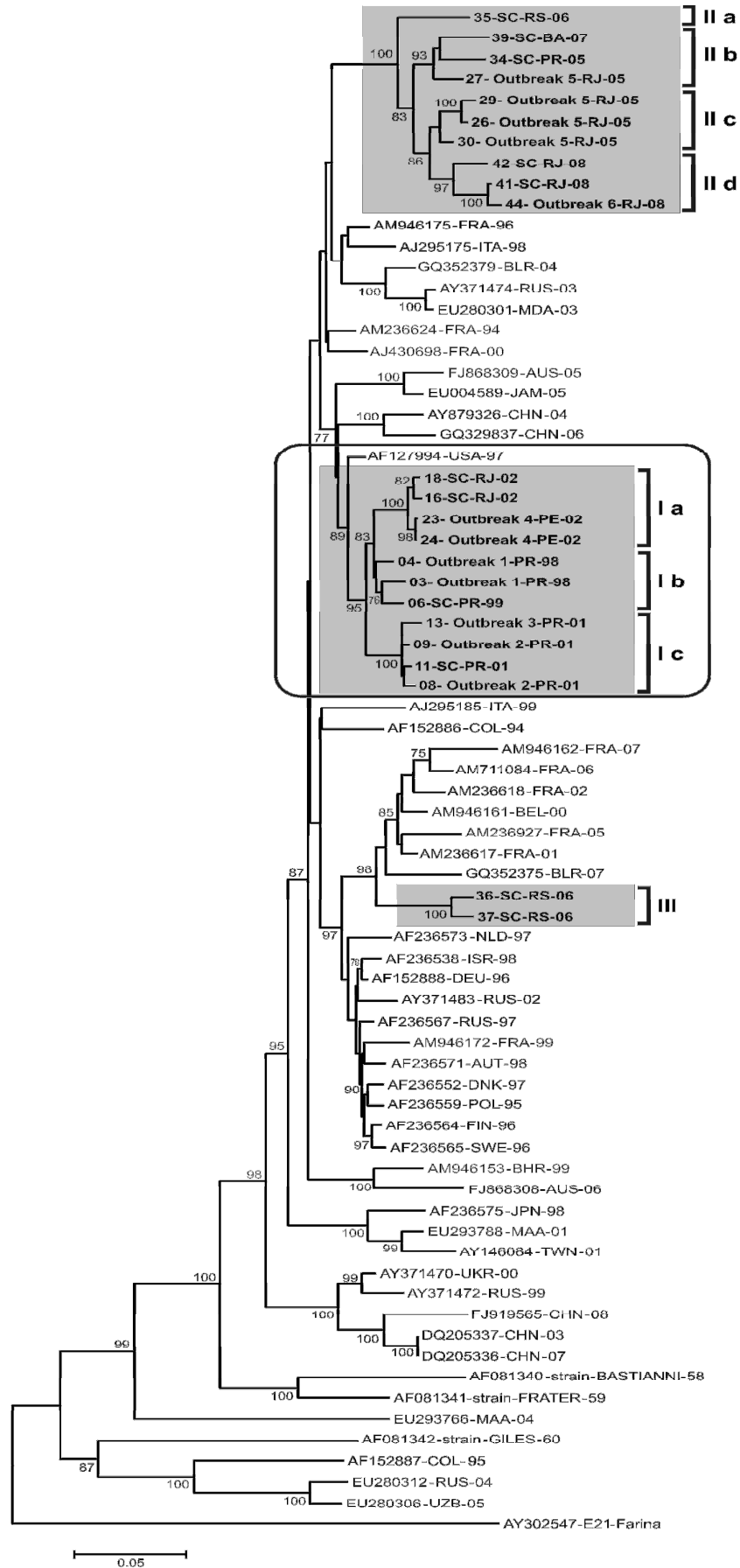
Os isolados do Grupo I foram geneticamente relacionados com uma sequência de um isolado de 1997 dos Estados Unidos. Esta sequência divergiu do Grupo I em 2,4 – 5,7% (**FIGURA 20**).

Dois isolados de 2007 da Argentina apresentaram uma relação estreita com os isolados do grupo III (apenas 5,8 - 6,0% de divergência genética, com *bootstrap* de 99%) (**FIGURA 21**).

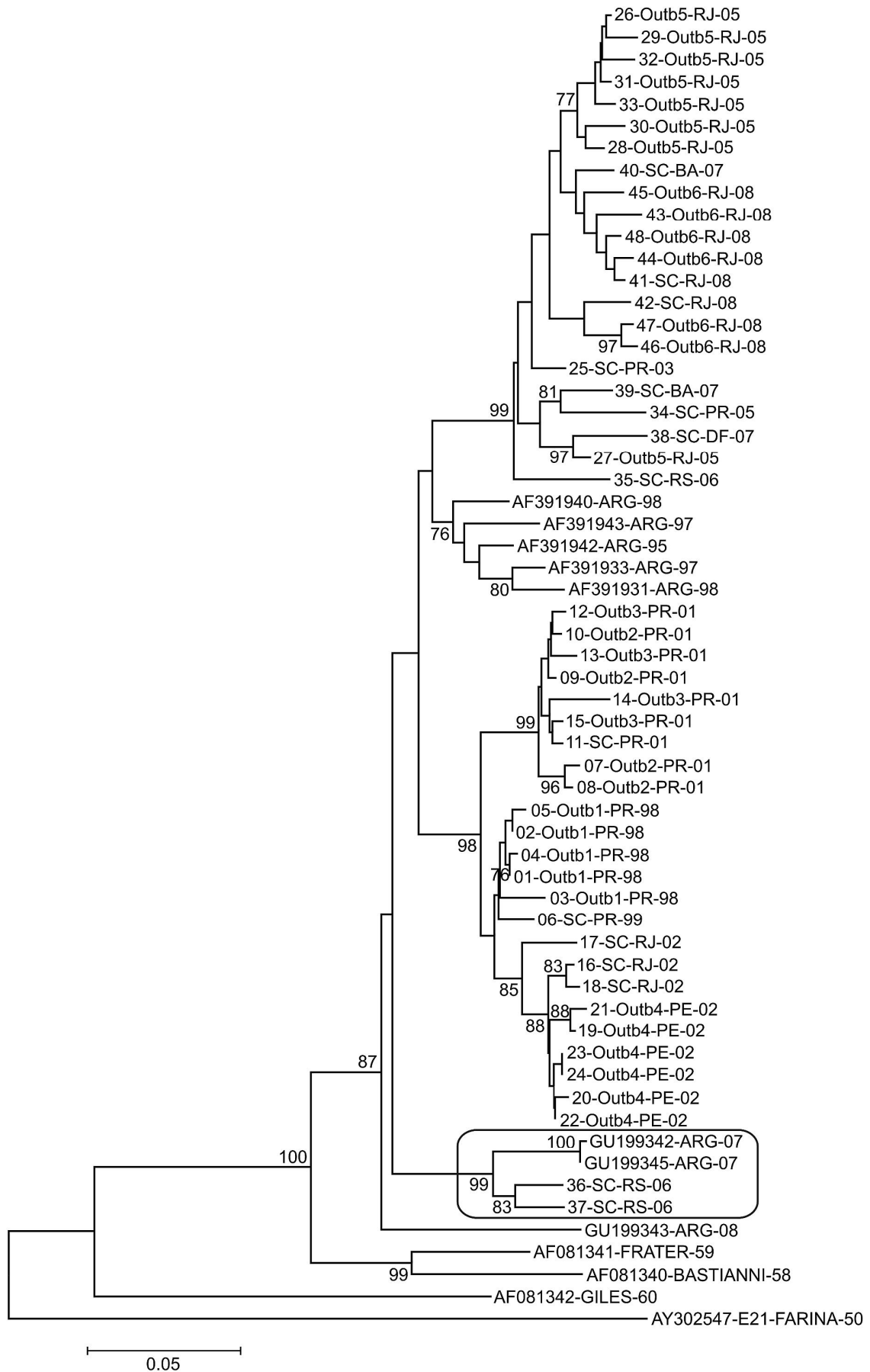
#### 4.2.3.3 Análise de similaridade de aminoácidos da VP1 de E30

As sequências de aminoácidos da proteína VP1 de E30 (292 aminoácidos) determinadas neste estudo apresentaram pelo menos 89,7% de similaridade com a cepa protótipo Bastianni (**TABELA 06**). Estas sequências de aminoácidos eram muito semelhantes entre si, variando de 92,5 a 100% de similaridade, demonstrando o alto grau de conservação dos aminoácidos da proteína VP1. O isolado 35-SC-RS-06 foi o mais divergente entre eles (92,5%). Nas comparações entre as sequências de aminoácidos da proteína VP1 dos isolados de E30 de um mesmo surto, as similaridades foram de, no mínimo, 95,5% (**TABELA 07**).

**FIGURA 20 – Análise Filogenética das sequências do Gene VP1 (876 nt) de representantes dos Grupos I, II e III e de 46 isolados de outros países.**



**FIGURA 21 – Análise Filogenética das Sequências Parciais do Gene VP1 (420 nt) de 48 Echovírus 30 Isolados no Brasil e de oito Sequências da Argentina.**



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 DETECÇÃO MOLECULAR DE ENTEROVÍRUS EM AMOSTRAS NEGATIVAS QUANTO AO ISOLAMENTO VIRAL EM CULTURAS DE CÉLULAS

As infecções virais agudas do sistema nervoso central formam um conjunto de doenças de ampla distribuição mundial, acometendo populações de forma esporádica, endêmica e/ou epidêmica. Os quadros clínicos dessas infecções constituem-se principalmente por meningites e encefalites. A meningite asséptica é uma síndrome infecto-contagiosa e os enterovírus são os agentes etiológicos predominantes. Eles estão envolvidos em mais de 80% dos casos onde o agente etiológico é identificado (PALLANSCH; ROOS, 2001).

Diversos sorotipos de enterovírus são descritos como responsáveis por surtos e casos esporádicos de meningite asséptica no mundo. Entre eles, podem ser citados echovírus 4, 6, 13, 30 e coxsackievírus B5 (CHOI et al, 2010; DOS SANTOS et al, 2006; JULIÁ et al, 2009; KMETZSCH et al, 2006; MIRAND et al, 2008; PINTO JUNIOR et al, 2009; TAVAKOLI et al, 2008; THOELLEN et al, 2003).

A maioria dos dados acerca da etiologia dos casos de meningite asséptica provem de estudos realizados em países desenvolvidos (BAILLY et al, 2009; HAYASHI et al, 2009; MIRAND et al, 2008; PIQUEUR et al, 2009). Entretanto, alguns estudos tem sido realizados no país (CASTRO et al, 2009; DOS SANTOS et al, 2006, 2011; KMETZSCH et al, 2006; PACHECO, 1999; PINTO JUNIOR et al, 2009; SILVA et al, 2002; SOARES et al, 2010).

O objetivo geral deste estudo foi o aprimoramento do diagnóstico laboratorial dos casos de meningite asséptica e meningoencefalite, com uma abordagem diferente da que é utilizada atualmente na rotina do Laboratório de Enterovírus (LEV).

O LEV é Centro de Referência Nacional para Enterovirose, para o Ministério da Saúde, e internacional para a Organização Mundial da Saúde (OMS), estando inserido no Programa de Erradicação da Poliomielite. Por isso, recebe amostras de casos com suspeita de infecções por enterovírus, como paralisias flácidas agudas, meningite asséptica, conjuntivite e miocardite, seguindo as recomendações preconizadas pela OMS (WHO, 2004). A dinâmica de diagnóstico envolve a tentativa de isolamento viral em culturas de células a partir de amostras clínicas como fezes, LCR e swab retal, entre outras. Atualmente, independente do tipo de amostra clínica, somente quando há presença de efeito citopático característico em cultura de células é realizada a detecção molecular de enterovírus a partir da suspensão celular.

Em um estudo realizado no LEV, a taxa de isolamento de enterovírus a partir de casos de meningite asséptica foi de 15,8% (DOS SANTOS et al, 2006). Entretanto, não se pode afirmar que os numerosos casos não esclarecidos sejam negativos. Em um estudo que identificou alguns agentes etiológicos de meningite e encefalite no Rio de Janeiro (PACHECO, 1999), foi verificada uma taxa de 69% de meningite e/ou encefalite com etiologia indeterminada.

A alta taxa de negatividade e de indeterminação da etiologia encontrada nos estudos supracitados pode ser reflexo de alguns fatores, tais como: possíveis problemas na armazenagem e no transporte dos materiais clínicos, coleta tardia dos LCRs e a possível baixa sensibilidade das culturas celulares utilizadas, que podem não ser adequadas para o isolamento de alguns agentes virais (KING et al, 2007).

O potencial da técnica de RT-PCR foi avaliado para a detecção de RNA de enterovírus em suspensões fecais em casos de paralisia flácida aguda (SANTOS et al, 2002). Foi observado que aproximadamente 15% das amostras clínicas previamente negativas quanto ao isolamento viral mostraram-se positivas por RT-PCR.

No presente estudo, foram analisadas 267 amostras de LCR recebidas entre 2008 e 2009, que apresentaram resultados negativos para enterovírus por isolamento em cultura de células RD e HEp2. Estas linhagens celulares são permissivas à replicação da maioria dos enterovírus conhecidos (WHO, 2004). Após extração do RNA viral e síntese do cDNA a partir dos LCRs, foi realizada PCR grupo-específica para detecção de enterovírus.

Foram testadas algumas opções de kits para extração do RNA viral, como o reagente Trizol LS (Invitrogen) e os kits de extração *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche) e Nuclisens (Biomérieux). Também foram realizados testes com outros kits de síntese de cDNA (*SuperScriptII* e *SuperScriptIII Reverse Transcriptase* - Invitrogen), mas os kits *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN) e o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems*) apresentaram rendimento superior para a extração de RNA e síntese de cDNA, respectivamente, sendo os métodos escolhidos para a realização deste estudo (dados não mostrados).

A taxa de positividade (22,1%) para enterovírus em amostras previamente consideradas negativas quanto ao isolamento viral, demonstra que a pesquisa do genoma viral diretamente dos LCRs é apropriada para um aumento na possibilidade de detecção de enterovírus neste tipo de amostra clínica. Este resultado foi confirmado por sequenciamento nucleotídico parcial.

A PCR realizada neste estudo amplifica uma parte da região 5'NC de enterovírus utilizando iniciadores regulares, ou seja, sem bases degeneradas em sua sequência nucleotídica. Este tipo de iniciador tem uma menor chance de hibridizar em sítios inespecíficos no genoma viral. A escolha de uma região conservada do genoma dos enterovírus aliada ao uso deste tipo de iniciador e ao método de extração de RNA escolhido colaboraram para a detecção viral nas amostras.

Alguns aspectos dos pacientes foram analisados. A idade variou de quatro dias a 72 anos. Aproximadamente 48% dos pacientes tinham menos de 12 anos de idade e não houve predominância em relação ao sexo. Esses resultados reiteram as características epidemiológicas de pacientes acometidos por meningite asséptica reportados em outro estudo realizado no Brasil, com amostras de 1998 a 2003 (DOS SANTOS et al, 2006).

Considerando que todas as amostras utilizadas no estudo haviam apresentado resultado negativo no isolamento viral, foi possível comparar o desempenho da técnica de extração direta do LCR frente ao isolamento viral em cultura de células para recuperação do RNA viral e sua posterior detecção molecular.

O isolamento viral em culturas de células é um método clássico, sendo considerado como padrão ouro de diagnóstico de enterovírus, sendo uma ferramenta útil e confiável para a obtenção do vírus e para o aumento do título viral. No entanto, num contexto atual em que cada vez mais se busca uma maior sensibilidade e rapidez para os testes diagnósticos, faz-se necessária uma reflexão acerca do uso de cultivos celulares para o diagnóstico conclusivo de enterovírus em LCR. Diversos estudos relatam que a detecção de enterovírus por PCR é mais sensível que testes baseados em cultura celular, além de ser mais rápida e capaz de detectar o genoma de vírus que não se replicam em cultura (BENSCHOP et al, 2010; ITURRIZA-GÓMARA; MEGSON; GRAY, 2006; NIGROVIC; CHIANG, 2000; SHOJA et al, 2007; VAN DOORNUM et al, 2007; VERSTREPEN et al, 2001). Buxbaum e colaboradores (2001) também encontraram uma maior positividade de enterovírus em LCRs com o uso da extração de RNA seguida de RT-PCR em comparação com o isolamento viral em cultura de células. Este autor sugere o uso dos dois métodos para a detecção de enterovírus.

Em estudo realizado por Santos e colaboradores (2002), 15% das amostras de fezes previamente negativas para o isolamento viral em cultura de células foram positivas para enterovírus por RT-PCR, enquanto Shoja e colaboradores (2007), verificaram uma taxa de 10%. Talvez esta menor proporção de positividade em relação ao encontrado no presente estudo (22,1%) seja devido à maior facilidade de isolamento viral a partir de amostras de fezes, em comparação com o LCR. Neste caso, a utilização da extração direta da amostra

clínica para recuperação do ácido nucléico viral e posterior detecção molecular teve um valor maior ao ser empregada nas amostras de LCR do que para as amostras de fezes.

A detecção direta de RNA de enterovírus em LCR pode melhorar o diagnóstico laboratorial desses vírus e ser de grande utilidade para a vigilância dos casos de meningite asséptica e meningoencefalite ocorridos no Brasil. Esta metodologia seria aplicável especificamente para amostras de LCR, em que baixos títulos virais já são esperados e também em surtos, cujas amostras demandam resultados rápidos para que ações de saúde pública e de vigilância epidemiológica possam ser tomadas, a fim de evitar o espalhamento viral e a transmissão da doença na população.

Numa alternativa ao fluxo tradicional, as amostras de LCR recebidas seriam submetidas à extração direta do RNA seguida de RT-PCR e, em paralelo, a uma passagem em cultura de células numa tentativa de isolamento viral. Desta forma, as amostras com alto título viral teriam seu resultado positivo definido em um tempo mais curto, não requerendo uma segunda passagem. As amostras negativas na primeira passagem seguiriam o algoritmo atual usado pelo LEV para isolamento viral e seriam submetidas a uma segunda passagem, a fim de minimizar a possibilidade de resultados falso-negativos.

Além das implicações epidemiológicas supracitadas, o diagnóstico rápido é crucial para o paciente, pois reduz o uso desnecessário de antibióticos e o tempo de hospitalização, e também para o sistema de saúde, pois acarreta a redução no custo do paciente para os serviços de saúde (BRASIL, 2009; BURKE; MONATH, 2001; BUXBAUM et al, 2001; NIGROVIC; CHIANG, 2000; OBERSTE et al, 1999; SHOJA et al, 2007; VERSTREPEN et al, 2001).

Os conhecimentos gerados a partir deste estudo garantem um embasamento técnico-científico para justificar maiores investimentos em métodos diagnósticos para a meningite asséptica no Brasil e para estimular novos avanços no diagnóstico de enterovírus.

## 5.2 DETECÇÃO MOLECULAR DE FLAVIVÍRUS EM CASOS DE MENINGITE ASSÉPTICA E MENINGOENCEFALITE

O objetivo deste estudo foi analisar o potencial papel etiológico de flavivírus, como WNV, em casos de meningite asséptica e meningoencefalite no Brasil. A associação de WNV com doenças neuroinvasivas tem sido investigada em diversos países (BARZÓN et al, 2009;

FEKI et al, 2005; GYURE, 2009; KOPEL et al, 2011; MORGAN, 2006), mas no Brasil não existe uma política de vigilância sistemática para esses agentes virais em tais casos.

Com o crescente volume de viagens e comércio internacionais, diversos microrganismos patogênicos podem facilmente se mover entre os continentes (NASH et al, 2001). O risco de casos inesperados de doenças importadas justifica medidas de vigilância clínica, laboratorial e ambiental para evitar disseminação. Este estudo contribui neste sentido.

As 208 amostras de LCR analisadas haviam sido testadas quanto à presença de enterovírus e apresentaram resultados negativos. Elas eram provenientes de casos de meningite asséptica e meningoencefalite ocorridos entre 2008 e 2009 em alguns Estados das regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste.

WNV é um vírus emergente presente em diversos países, conhecido por causar infecções neuroinvasivas. Ele é comumente envolvido em surtos e epidemias em diversos países (DAVIS et al, 2006; FEKI et al, 2005; GYURE, 2009; JULIAN et al, 2003; NASH et al, 2001; O'LEARY et al, 2004).

Um estudo recente relatou evidência sorológica de WNV em equinos no território brasileiro (PAUVOLID-CORRÊA et al, 2011), mas sua efetiva circulação entre humanos ainda é incerta. Como WNV está se espalhando na América do Sul (ADRIÁN DIAZ et al, 2008; BOSCH et al, 2007; MATTAR et al, 2005; MORALES et al, 2006), podendo levar a implicações importantes para a saúde pública, uma vigilância contínua e eficaz deste vírus em todo o país é indispensável.

Outros autores (CHÁVEZ; FIGUEIREDO, 2006; FIGUEIREDO, 2007) consideram a entrada de WNV no Brasil provável e iminente.

Duas abordagens moleculares para detecção de flavivírus foram descritas neste estudo. Para o desenvolvimento da *Semi-Nested-PCR* foram desenhados os iniciadores F1, R1 (externos) e F2 (interno), que hibridizam na região do gene NS5 de flavivírus. Para a PCR convencional, os iniciadores utilizados foram FLAPCRF e FLAPCRR, que também são específicos para a NS5. Por ser uma região conservada no genoma de flavivírus, a NS5 é utilizada com sucesso na identificação desses vírus (MOUREAU et al, 2007; SCARAMOZZINO et al, 2001).

Os pares de iniciadores utilizados possibilitaram a amplificação dos flavivírus testados, mostrando serem ferramentas úteis para a detecção de flavivírus em poucas horas. Isto é particularmente relevante considerando a iminente entrada de WNV no Brasil.

Técnicas baseadas em PCR têm sido amplamente utilizadas para detectar o ácido nucléico de WNV a partir de amostras clínicas humanas, mosquitos e aves (BURKE;



MONATH, 2001; FEKI et al, 2005; LANCIOTTI et al, 2000; MORAIS BRONZONI et al, 2005; RE et al, 2008).

A aplicação da *Semi-Nested-PCR* e da PCR convencional não mostrou qualquer evidência de ácido nucléico de flavivírus nos LCRs analisados. Treze amostras foram consideradas indeterminadas. Contudo, o sequenciamento nucleotídico não confirmou a presença de flavivírus nestas amostras. Estes resultados indeterminados podem ter ocorrido pelo fato de os iniciadores serem degenerados, o que permite sua hibridação em regiões do genoma humano (ou em genomas de outros agentes presentes na amostra) semelhantes às do genoma de flavivírus. Outras investigações são necessárias a fim de esclarecer a etiologia desses casos.

As amostras foram ainda submetidas a tentativas de reamplificação, utilizando 1µl dos produtos amplificados, em novas reações de PCR, com o uso dos mesmos iniciadores (F2, R1, FlaPCRR e FlaPCRF) e nas mesmas condições das primeiras reações. Para a *Semi-Nested-PCR*, a reamplificação foi realizada com o produto amplificado no segundo *round*. Este procedimento aumenta a sensibilidade da técnica, já que nele ocorreria a amplificação da amplificação. No entanto, não houve alteração nos resultados com estas tentativas.

Estes resultados sugerem a ausência de flavivírus, como WNV, JEV ou SLEV nos LCRs analisados. Sendo assim, as áreas estudadas parecem permanecer livres da circulação desses agentes virais.

No entanto, a ausência de casos de meningite e meningoencefalite devido ao WNV descrita neste estudo não exclui a hipótese de sua circulação silenciosa ou sua manutenção apenas em aves e equinos no Brasil.

Na verdade, esse vírus já pode estar no país, mas a falta de um programa de vigilância para WNV em escala nacional e as características clínicas de WNV impedem conclusões definitivas sobre esta questão. As semelhanças dos sintomas entre infecções por WNV e dengue podem dificultar o diagnóstico clínico e, certamente, levar a subestimação do número destes casos. Além disso, 80% dos indivíduos infectados pelo WNV são assintomáticos, aproximadamente 20% desenvolvem a chamada febre do Nilo Ocidental, uma doença febril benigna e menos de 1% dos indivíduos infectados desenvolvem doenças neuroinvasivas (DAVIS et al, 2006; MACKENZIE et al, 2004).

Em regiões tropicais, especificamente, doenças neurológicas graves são raras nas infecções por WNV. Uma razão para esta baixa morbidade é a existência de um mecanismo de reatividade cruzada de anticorpos em indivíduos previamente infectados com outros flavivírus, muitos deles endêmicos nestas regiões, o que leva a uma redução da carga viral e a

consequente atenuação do quadro clínico. Outros fatores associados ao hospedeiro ou ao ambiente também podem levar à minimização da gravidade dessas infecções (CHÁVEZ; FIGUEIREDO, 2006; GYURE, 2009).

Na avaliação das idades dos pacientes com amostras de LCR analisadas neste estudo, foi observado que aproximadamente 8% dos pacientes analisados tinham mais de 46 anos, pertencendo à faixa etária de maior risco para infecção por WNV (BRASIL, 2009; DAVIS et al, 2006). Isso justifica a continuidade da busca por esses agentes no Brasil.

A vigilância de casos suspeitos de infecção por WNV e a investigação retrospectiva dos casos de meningite e meningoencefalite de etiologia desconhecida levaram à identificação de seis pacientes com infecção por WNV na Itália (BARZÓN et al, 2009). Assim, WNV, e também outros flavivírus, como JEV e SLEV, devem ser seriamente considerados no diagnóstico diferencial da meningite asséptica e meningoencefalite no Brasil.

Apesar da inerente sensibilidade, especificidade e robustez, a PCR pode não ter apresentado sensibilidade suficiente para detectar RNA de flavivírus nas amostras de LCR deste estudo. Em pacientes com doença neuroinvasiva por WNV nos Estados Unidos, este método foi 100% específico, mas demonstrou uma sensibilidade inferior à detecção de IgM de WNV no LCR (LANCIOTTI et al, 2000). Por outro lado, os métodos sorológicos de diagnóstico têm desvantagens como inespecificidade, devido à reatividade cruzada entre flavivírus relacionados e o longo tempo exigido pela técnica de PRNT, que poderia confirmar o diagnóstico (LANCIOTTI et al, 2000; SPINSANTI et al, 2008).

Resultados negativos para WNV, encontrados neste estudo, concordam com outros resultados anteriores no Brasil (CHÁVEZ; FIGUEIREDO, 2006; SOARES et al, 2010) e apontam para a necessidade de estudos adicionais sobre este vírus. Morgan (2006), mesmo sem um resultado positivo, analisando 123 LCRs na Inglaterra e no País de Gales, destacou a relevância de um sistema estruturado de vigilância para WNV.

Este foi um estudo preliminar. O aprimoramento das técnicas para a identificação de WNV e outros flavivírus em casos de meningite asséptica e meningoencefalite no Brasil é necessário para o estabelecimento de uma contínua vigilância desses agentes virais em território nacional.

### 5.3 ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ECHOVÍRUS 30

*Echovirus* (Enteric Cytopathogenic Human Orphan virus) sorotipo 30 (E30) é um dos enterovírus mais associados a casos de meningite asséptica e meningoencefalites, em diversos países, sendo responsável tanto por surtos quanto por casos esporádicos (BAILLY et al, 2002; CHOI et al, 2010; HAYASHI et al, 2009; JULIÁ et al, 2009; TRALLERO et al, 2000).

Este vírus é classificado, segundo características genéticas, como membro da espécie B de enterovírus, a qual também pertencem todos os outros echovírus, coxsackievírus B, coxsackievírus A9, entre outros (KNOWLES et al, 2011). A elevada variação genética dos enterovírus, incluindo os sorotipos da espécie B, é determinada pela ausência de revisão pela RNA polimerase e também por eventos de recombinação, que são muito frequentes entre os diferentes sorotipos desta espécie (LINDBERG et al, 2003; MCWILLIAM LEITCH et al, 2009; MIRAND et al, 2007).

O frequente envolvimento de enterovírus em casos de meningite asséptica pode ser decorrente da eficiência de transmissão (OBERSTE et al, 1999) e disseminação destes agentes na população. Uma contínua circulação de E30 no Brasil tem sido observada nos últimos anos. Por exemplo, entre 1998 e 2008 diversos casos esporádicos e pelo menos sete surtos de meningite asséptica, com enterovírus como agente etiológico, foram identificados. Seis deles foram causadas por E30 (DOS SANTOS et al, 2006; KMETZSCH et al, 2006).

Um estudo molecular de variabilidade genética foi realizado para estabelecer associações entre sequências do gene que codifica para a proteína VP1 de cepas de E30, isoladas a partir de LCRs de casos de meningite asséptica ocorridos no Brasil entre 1998 e 2008. Um total de 302 enterovírus não-Polio (EVNP) foram isolados em culturas de células durante este período. A maioria dos isolados ( $n = 177$ , 58,6%) foram identificados como E30. Estes são provenientes de seis surtos e 51 casos esporádicos que ocorreram em nove Estados brasileiros. A taxa de isolamento média observada entre os surtos foi de 33%. Esse valor concorda com um estudo que identificou cinco surtos de meningite asséptica no Brasil entre os anos de 1998 e 2003, em que foi encontrada uma taxa de isolamento de enterovírus de aproximadamente 35% entre os surtos (DOS SANTOS et al, 2006).

As relações filogenéticas inferidas a partir de comparações de 48 sequências do gene da VP1 de E30, isolados no Brasil entre 1998 e 2008, revelaram a existência de dois principais Grupos distintos, que se apresentaram temporalmente segregados, e um Grupo com duas sequências altamente divergentes, provenientes de casos esporádicos ocorridos em 2006. As sequências agrupadas nos dois Grupos principais foram ainda classificadas em sete

subgrupos distintos. A separação das sequências em subgrupos distintos também foi relacionada ao período de ocorrência dos casos de meningite asséptica, agrupando-se isolados de surtos e de casos esporádicos de diferentes áreas geográficas. Estes dados sugerem introduções distintas de E30 em território brasileiro causando tanto surtos quanto casos esporádicos de meningite asséptica.

O amplo uso da VP1 para estudos sobre enterovírus é justificado por sua importância na estrutura desses vírus. Ela é a proteína mais externa do capsídeo, apresentando alta variabilidade nucleotídica (BAILLY et al, 2009; MCWILLIAM LEITCH et al, 2009). Esse atributo possibilita o uso desta proteína tanto na identificação molecular do sorotipo viral envolvido quanto em estudos de diversidade genética (BAILLY et al, 2002, 2009; DOS SANTOS et al, 2006; KUNKEL; SCHREIER, 2000; LEITCH et al, 2009; OBERSTE et al, 1999; PALACIOS et al, 2002; PAPA et al, 2009; RACANIELLO, 2007; RAHIMI et al, 2009; SAVOLAINEN; HOVI; MULDER, 2001). Além disso, ela é relevante também para a imunidade aos enterovírus, sendo o principal alvo para anticorpos neutralizantes (CABRERIZO et al, 2008; KE et al, 2011; LEITCH et al, 2009; LEVEQUE et al, 2010).

Com a aplicação da análise filogenética, é possível estudar a diversidade genética, com a subdivisão em subgrupos ou linhagens, e traçar ligações genéticas entre os isolados virais (PAGE; HOLMES, 1998). Os relacionamentos genéticos entre as cepas de E30 do Brasil e a cepa protótipo Bastianni estabelecidos neste estudo concordam com outros estudos reportados (BAILLY et al, 2000a, 2002; MIRAND et al, 2006). A divergência em comparações das cepas de E30, entre si, variou de 0,2% a 13,8%. Resultados semelhantes já foram anteriormente descritos (CARO et al, 2001; OBERSTE et al, 1999; SAVOLAINEN; HOVI; MULDER, 2001).

Os subgrupos dos Grupos I e II estavam relacionados ao ano de isolamento. Isto foi confirmado pelos baixos valores de divergências entre os isolados em 2001, 2002 e 2008. Estes resultados demonstraram altas similaridades genéticas entre os E30 isolados no mesmo surto e são consistentes com a literatura (BAILLY et al, 2009; GJOEN; BRUU; ORSTAVIK, 1996). Isolados de 1998 e 1999 agruparam em um único subgrupo no Grupo I (Ib) e podem ter um ancestral comum.

Os resultados sugerem que houve a circulação simultânea de pelo menos duas variantes diferentes de E30 no Brasil em 2005, dado que o isolado 34-SC-PR-05 não se agrupou com os outros isolados. A origem geográfica dos isolados apóia a hipótese de isolados co-circulantes em 2005: o isolado 34-SC-PR-05 era de um caso esporádico ocorrido no Estado do Paraná, enquanto os demais isolados foram de um surto que ocorreu no Estado

do Rio de Janeiro. Casos esporádicos são mais propensos a ter origens independentes do que os surtos.

Três cepas de E30 (35-SC-RS-06, 36-SC-RS-06, e 37-SC-RS-06) isoladas de casos esporádicos ocorridos no Rio Grande do Sul em 2006 foram significativamente diferentes dos outros isolados de E30. Elas parecem ter sido introduzidas independentemente no Brasil.

O padrão de agrupamento de 39-SC-BA-07, um isolado do Estado da Bahia em 2007, com cepas de E30 isoladas no Pará em 2005 e 2006 sugerem que alguma das cepas do Pará tenha originado a cepa da Bahia ou que todas elas possuam um ancestral comum recente. Em geral, isolados de E30 circulantes no mesmo período estavam geneticamente relacionados uns aos outros. O agrupamento do Grupo I persistiu por cinco anos e o do Grupo II persistiu por seis anos.

Além disso, baseados na estreita relação genética entre as sequências nucleotídicas, que apresentaram 94-94,2% de similaridade, e pela proximidade geográfica entre o Rio Grande do Sul e a Argentina, os dados também sugerem que um dos isolados de E30 pertencentes ao Grupo III pode ter originado as cepas de E30 encontradas na Argentina no ano seguinte (2007). Da mesma forma, o forte relacionamento genético entre o Grupo I e o isolado de 1997 dos EUA sugere uma origem comum.

A variabilidade de aminoácidos das cepas de E30 demonstrou que eles eram muito semelhantes entre si (92,5-100% de identidade). Esses resultados concordam com os estudos moleculares existentes sobre E30 (CARO et al, 2001; CASTRO et al, 2009; OBERSTE et al, 1999; SAVOLAINEN; HOVI; MULDER, 2001). As mudanças de aminoácidos e sua possível relevância biológica não foram investigadas.

A diversidade genética em enterovírus é relativamente comum e é demonstrada pelos muitos sorotipos distintos (DE FILIPPIS; VILLARREAL, 2001; KNOWLES et al, 2011) e por variações nos sorotipos, como ocorre com E30 (BAILLY et al, 2002; KUNKEL; SCHREIER, 2000; OBERSTE et al, 1999; SAVOLAINEN; HOVI; MULDER, 2001). Este sorotipo tem sido extensivamente estudado em todo o mundo e os resultados corroboram o seu potencial de variabilidade genética (BAILLY et al, 2000b, 2009; CASTRO et al, 2009; PALACIOS et al, 2002).

A análise filogenética permitiu a caracterização genética de 48 sequências de VP1 de E30, representativas dos casos de meningite asséptica de quase todas as regiões brasileiras durante um período de 10 anos. O conhecimento adquirido com este estudo tem significativa relevância para a compreensão do comportamento de E30 em termos de dispersão, circulação, transmissão e persistência em populações suscetíveis.

## 6 CONCLUSÕES

- O fluxo alternativo baseado na extração de RNA a partir da amostra de LCR, seguida de síntese de cDNA e PCR grupo-específica mostrou-se adequado e eficiente para a detecção do RNA de enterovírus em amostras previamente negativas quanto ao isolamento em cultura de células;
- Entre as amostras utilizadas no estudo, 22,1% eram, na verdade, falso-negativas para enterovírus;
  
- Os pares de iniciadores descritos para detecção molecular de flavivírus pelas duas abordagens desenvolvidas neste estudo foram capazes de amplificar o genoma de flavivírus utilizados como controles;
- Nenhum flavivírus foi detectado nas amostras clínicas;
- Diante dos resultados negativos encontrados para flavivírus, da possibilidade da circulação silenciosa de WNV ou de sua entrada iminente no país, é evidenciada a necessidade de estudos adicionais sobre este vírus;
  
- E30 foi o principal enterovírus envolvido nos casos de meningite asséptica e meningoencefalite no país, tendo sido o agente etiológico de seis surtos ocorridos entre 1998-2008 nas regiões sul, sudeste e nordeste;
- Nas análises filogenéticas, o agrupamento dos isolados de E30 foi fortemente relacionado ao período de ocorrência dos casos de meningite asséptica;
- Em 2005, houve a circulação simultânea de pelo menos duas variantes genéticas de E30 no Brasil;
- É provável que uma das cepas de E30 isoladas no Pará em 2005/2006 tenha originado uma cepa de E30 isolada na Bahia em 2007, ou que elas possuam um ancestral comum recente;
- Uma das cepas de E30 isoladas em dois casos esporádicos em 2006 no Rio Grande do Sul pode ter originado as cepas de E30 isoladas na Argentina no ano seguinte; e
- É provável que as cepas de E30 isoladas entre 1998 e 2002 no Brasil sejam originárias de um isolado dos EUA de 1997, ou que eles possuam uma origem comum.

## **7 PERSPECTIVAS**

- Realizar a tipagem molecular das amostras com enterovírus detectados, por sequenciamento nucleotídico parcial da VP1;
- Otimizar a técnica de PCR em tempo real para pesquisa de enterovírus em LCR;
- Adaptar o uso dos iniciadores F1, F2, R1, FlaPCRR E FlaPCRF para a técnica de PCR em tempo Real;
- Pesquisar anticorpos IgM e/ou IgG anti-flavivírus em LCR;
- Realizar o acompanhamento sistemático da filogenia de E30 no Brasil; e
- Pesquisar outros vírus, como Herpesvírus e vírus da caxumba, entre outros, em LCR.

## REFERÊNCIAS

- ADRIÁN DIAZ, L. et al. West Nile virus in birds, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 689-691, 2008.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ARCHIMBAUD, C. et al. Improved diagnosis on a daily basis of enterovirus meningitis using a one-step real-time RT-PCR assay. **Journal of Medical Virology**, v. 74, n. 4, p. 604-611, 2004.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR NM ISO 15189**: Laboratórios de análises clínicas – Requisitos especiais de qualidade e competência. Rio de Janeiro, 2008. 57p.
- BAILLY, J.L. et al. Nosocomial transmission of Echovirus 30: Molecular evidence by phylogenetic analysis of the VP1 encoding sequence. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2889–2892, 2000a.
- BAILLY, J.L. et al. Genetic diversity of echovirus 30 during a meningitis outbreak demonstrated by direct molecular typing from cerebrospinal fluid. **Journal of Medical Virology**, v. 68, p. 558–567, 2002.
- BAILLY, J.L. et al. Genomic variations in echovirus 30 in persistent isolates recovered from a chronically infected immunodeficient child and comparison with the reference strain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 552–557, 2000b.
- BAILLY, J.L. et al. Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50 years: nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 699-708, 2009.
- BARZON, L. et al. West Nile virus infection in Veneto region, Italy, 2008-2009. **Euro Surveillance**, v. 14, n. 31, p. 1-4, 2009. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19289>>. Acesso em: 22 set. 2011.
- BENSCHOP, K. et al. Detection of human enterovirus and human parechovirus (HPeV) genotypes from clinical stool samples: polymerase chain reaction and direct molecular typing, culture characteristics, and serotyping. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, n. 2, p. 166-173, 2010.
- BOSCH, I. et al. *West Nile virus*, Venezuela. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 651-653, 2007.
- BOUSLAMA, L. et al. Natural recombination event within the capsid genomic region leading to a chimeric strain of human enterovirus B. **Journal of Virology**, v. 81, p. 8944–8952, 2007.
- BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de Setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços



correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7ª Edição. Brasília, 2009. 816p.

BRASIL. Portaria nº 5, de 21 de Fevereiro de 2006. Inclui doenças na relação nacional de notificação compulsória, define doenças de notificação imediata, relação dos resultados laboratoriais que devem ser notificados pelos Laboratórios de Referência Nacional ou Regional e normas para notificação de casos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, Brasília, DF. 22 fev. 2006.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota Técnica sobre surto de meningite**. Brasília, 2007. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota\\_tecnica\\_surto\\_meningite\\_2007\\_svs.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tecnica_surto_meningite_2007_svs.pdf)>. Acesso em: 09 set. 2007.

BRASIL, P. et al. Meningoencefalites infecciosas. In: COURA, J.R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2005. v. 1, p. 297-318.

BRITTO, C.; PRIMEZ, C.; FERNANDES, O. Técnicas Básicas de Diagnóstico Molecular em Doenças infecciosas e parasitárias. In: COURA, J.C. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 2005. v. 1, p. 195-214.

BROWN, B. et al. Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. **Journal of Virology**, v. 77, p. 8973-8984, 2003.

BUCK, G.E.; WIESEMANN, M.; STEWART, L. Comparison of mixed cell culture containing genetically engineered BGMK and CaCo-2 cells (Super E-Mix) with RT-PCR and conventional cell culture for the diagnosis of enterovirus meningitis. **Journal of Clinical Virology**, v. 25, s. 1, n. 1, p. s13-18, 2002.

BURKE. D.S.; MONATH, T.P. Flaviviruses In: KNIPE D.M. et al. **Fields virology**. 4. edição. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1043-1125.

BURLAND, T.G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, p. 71-91, 2000.

BUXBAUM, S. et al. Enterovirus infections in Germany: comparative evaluation of different laboratory diagnostic methods. **Infection**, v. 29, n. 03, p. 138-142, 2001.

CABRERIZO, M. et al. Molecular epidemiological study of HEV-B enteroviruses involved in the increase in meningitis cases occurred in Spain during 2006. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 6, p. 1018-1024, 2008.

CARO, V. et al. Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 79-91, 2001.

CASTRO, C.M. et al. Echovirus 30 associated with cases of aseptic meningitis in state of Pará, Northern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 444-450, 2009.

CHADWICK, D.R. Viral meningitis. **Brazilian Medical Bulletin**, v. 75, p. 01-14, 2005.

CHÁVEZ, J.H.; FIGUEIREDO, L.T.M. Emergent flaviviruses of the japanese encephalitis complex in Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 11, p. 28–32, 2006.

CHOI, Y.J. et al. Molecular characterization of echovirus 30-associated outbreak of aseptic meningitis in Korea in 2008. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 643-649, 2010.

CONNOLLY, K.J.; HAMMER, S.M. The acute aseptic meningitis syndrome. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 4, n. 4, p. 599-622, 1990.

COSTA, E.V. **Sequenciamento e análise genômica do Poliovirus tipo 1, cepa LS-c, precursora imediata da vacina Sabin 1**. 1999. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

COSTA, E.A.; ROZENFELD, S. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. In: ROZENFELD, S. **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2000, p. 15-40.

DAVIS, L.E. et al. West Nile virus neuroinvasive disease. **Annals of Neurology**, v. 60, n. 3, p. 286-300, 2006.

DEBIASI, R.L.; TYLER, K.L. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 903–925, 2004.

DEFILIPPIS, V.R.; VILLARREAL, L.P. Virus evolution. In: KNIFE, D.M. et al. **Fields virology**. 4. edição. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001. p. 353–370.

DOS SANTOS, G.P.L. et al. Enterovirus meningitis in Brazil, 1998-2003. **Journal of Medical Virology**, v. 78, n.1, p. 98-104, 2006.

DOS SANTOS, G.P.L. et al. Genetic diversity of Echovirus 30 involved in aseptic meningitis cases in Brazil (1998-2008). **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 12 p. 2164-2171, 2011.

EXPASY HOME PAGE. **Ilustrações de enterovírus e flavivírus**. Disponível em: <<http://www.expasy.org/viralzone/>>. Acesso em 03 dez. 2011.

FEKI, I. et al. Epidemic West Nile virus encephalitis in Tunisia. **Neuroepidemiology**, v. 24, n.1, p. 01-07, 2005.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783–791, 1985.

FIGUEIREDO, L.T.M. Emergent Arbovirus n Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n.2, p. 224-229, 2007.

FIGUEIREDO, L.T.M. The Brazilian flaviviruses. **Microbe and Infections**, v. 2, p. 1643-1649, 2000.

FRANZEN-ROHL, E.; et al. High diagnostic yield by CSF-PCR for entero- and herpes simplex viruses and TBEV serology in adults with acute aseptic meningitis in Stockholm. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 40, n. 11, p. 914-921, 2008.

GJOEN, K.; BRUU, A.L.; ORSTAVIK, I. Intratypic genome variability of echovirus type 30 in part of the VP4/VP2 coding region. **Archives of Virology**, v. 141, p. 901-908, 1996.

GOULD, E.A.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **Lancet**, v. 371, p. 500-509, 2008.

GRENÓN, S.L. et al. Outbreak of viral meningitis caused by echovirus type 4 in Misiones province. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 40, n. 1, p. 41-46, 2008.

GYURE, K.A. West Nile virus infections. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 68, n. 10, p. 1053-1060, 2009.

HABIB, A.A. et al. Varicella zoster virus meningitis with hypoglycorrhachia in the absence of rash in an immunocompetent woman. **Journal of Neurovirology**, v. 15, n. 2, p. 206-208, 2009.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARRISON, L.H. Prospects for vaccine prevention of meningococcal infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 142-164, 2006.

HAYASHI, T. et al. An outbreak of aseptic meningitis due to echovirus 30 in a high school baseball club - Possible role of severe exercise for a high attack rate. **Internal Medicine**, v. 48, n. 19, p. 1767-1771, 2009.

HEIM, A.; SCHUMANN, J. Development and evaluation of a nucleic acid sequence based amplification (NASBA) protocol for the detection of Enterovirus RNA in cerebrospinal fluid samples. **Journal of Virological Methods**, v. 103, n. 1, p. 101-107, 2002.

IHEKWABA, U.K.; KUDESIA, G.; MCKENDRICK, M.W. Clinical features of viral meningitis in adults: significant differences in cerebrospinal fluid findings among herpes simplex virus, varicella zoster virus, and enterovirus infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 6, p. 783-789, 2008.

ISHIKO, H. et al. Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 744-754, 2002.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; MEGSON, B.; GRAY, J. Molecular detection and characterization of human enteroviruses directly from clinical samples using RT-PCR and DNA sequencing. **Journal of Medical Virology**, v. 78, n. 2, p. 243-253, 2006.

IWAMOTO, M. et al. Transmission of *West Nile virus* from an organ donor to four transplant recipients. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 22, p. 2196-2203, 2003.

JACQUES, J. et al. New reverse transcription-PCR assay for rapid and sensitive detection of enterovirus genomes in cerebrospinal fluid specimens of patients with aseptic meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5726-5728, 2003.

JONES, S.C. et al. St. Louis encephalitis outbreak in Louisiana in 2001. **Journal of Louisiana State Medical Society**, v. 154, n. 6, p. 303-306. 2002.

JULIÁ, M.L. et al. Meningitis outbreak caused by Echovirus serotype 30 in the Valencian Community. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 5, p. 263-268, 2009.

JULIAN, K.G. et al. Aseptic meningitis epidemic during a *West Nile virus* avian epizootic. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1082-1088, 2003.

KAUFMANN, B.; ROSSMANN, M.G. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. **Microbes Infection**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2011.

KE, G.M. et al. Molecular epidemiology of Echovirus 30 in Taiwan, 1988-2008. **Virus Genes**, v. 42, n. 2, p. 178-188, 2011.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KING, R.L. et al. Routine Cerebrospinal Fluid Enterovirus Polymerase Chain Reaction Testing Reduces Hospitalization and Antibiotic Use for Infants 90 Days of Age or Younger. **Pediatrics**, v. 120, n. 3, p. 489-496, 2007.

KMETZSCH, C.I. et al. Echovirus 13 aseptic meningitis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1289-1290, 2006.

KNOWLES, N.J. et al. *Picornaviridae*. In: KING, A.M.Q. et al. **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Oxford: Ed. Elsevier, 2011. p. 855-880.

KOMAR, N.; CLARK, G.G. *West Nile virus* activity in Latin America and Caribbean. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 19, n. 2, p. 112-117, 2006.

KOPEL, E. et al. Surveillance of West Nile virus Disease, Tel Aviv District, Israel, 2005 to 2010. **Euro Surveillance**, v. 16, n. 25, p. 1-7, 2011. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19894>>. Acesso em 20 set. 2011.

KRAMER, L.D.; LI, J.; SHI, P. *West Nile virus*. **Lancet Neurology**, v. 6, p. 171-181, 2007.

KUMAR, R. Aseptic meningitis: diagnosis and management. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 72, n. 1, p. 57-63, 2005.

KUMAR, S. et al. MEGA 2: Molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, v.17, n. 12, p. 1244-1245, 2001.

KUNKEL, U.; SCHREIER, E. Genetic variability within the VP1 coding region of echovirus type 30 isolates. **Archives of Virology**, v. 145, p. 1455–1464, 2000.

LANCIOTTI, R.S. et al. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4066-4071, 2000.

LANDRY, M.L.; GARNER, R.; FERGUSON, D. Rapid enterovirus RNA detection in clinical specimens by using nucleic acid sequence based amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 346–350, 2003.

LANDRY, M.L.; GREENWOLD, J.; VIKRAM, H.R. Herpes simplex type-2 meningitis: presentation and lack of standardized therapy. **American Journal of Medicine**, v. 122, n. 7, p. 688-691, 2009.

LASSMAN, H.; ZIMPRICH, F.; ROSSLER, K. Inflammation in the nervous system – Basic mechanisms and immunological concepts. **Revue Neurologique**, v. 147, p. 763-781, 1991.

LEE, B.E.; DAVIES, H.D. Aseptic meningitis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 20, p. 272-277, 2007.

LEE, Y.S. et al. PCR-RFLP based molecular typing of Enteroviruses isolated from patients with aseptic meningitis in Korea. **Archives of Virology**, v. 147, n. 9, p. 1711-1720, 2002.

LEIMKUGEL, J. et al. An outbreak of serotype 1 *Streptococcus pneumoniae* meningitis in northern Ghana with features that are characteristic of *Neisseria meningitidis* meningitis epidemics. **Journal of Infectious Diseases**, v. 192, p. 192-199, 2005.

LEITCH, E.C. et al. Direct identification of human enterovirus serotypes in cerebrospinal fluid by amplification and sequencing of the VP1 region. **Journal of Clinical Virology**, v. 44, n. 2, p. 119-124, 2009.

LÉVÊQUE, N. et al. Phylogenetic analysis of Echovirus 30 isolated during the 2005 outbreak in France reveals existence of multiple lineages and suggests frequent recombination events. **Journal of Clinical Virology**, v. 48, n. 2, p. 137-141, 2010.

LEYSEN, P.; DE CLERCQ, E.; NEYTS, J. Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 67-82, 2000.

LINDBERG, A.M. et al. Evolution of the genome of Human enterovirus B: incongruence between phylogenies of the VP1 and 3CD regions indicates frequent recombination within the species. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 1223–1235, 2003.

LUKASHEV, A.N. et al. Recombination in circulating enteroviruses. **Journal of Virology**, v. 77, p. 10423–10431, 2003.

MACKENZIE, J.S.; GUBLER, D.J.; PETERSEN, L.R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature Medicine**, v. 10, p. s98–109, 2004.

MATTAR, S. et al. *West Nile virus* antibodies in colombian horses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 11, p. 1497-1498, 2005.

MCWILLIAM LEITCH, E.C. et al. Transmission networks and population turnover of echovirus 30. **Journal of Virology**, v. 83, p. 2109–2118, 2009.

MIRAND, A. et al. Prospective identification of HEV-B enteroviruses during the 2005 outbreak. **Journal of Medical Virology**, v. 78, p. 1624–1634, 2006.

MIRAND, A. et al. Prospective identification of enteroviruses involved in meningitis in 2006 through direct genotyping in cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 87-96, 2008.

MIRAND, A. et al. Emergence of recent echovirus 30 lineages is marked by serial genetic recombination events. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 166–176, 2007.

MORAIS BRONZONI, R.V. et al. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 696-702, 2005.

MORALES, M.A. et al. *West Nile virus* isolation from equines in Argentina, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1559-1561, 2006.

MORGAN, D. Control of arbovirus infections by a coordinated response: West Nile virus in England and Wales. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 305-312, 2006.

MOSTASHARI, F. et al. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: Results of a household-based seroepidemiological survey. **Lancet**, v. 358, p. 261-264, 2001.

MOURA, R.A. et al. **Técnicas de Laboratório**, 3<sup>a</sup> Edição. Rio de Janeiro: Ed. Atheneu, 2002.

MOUREAU, G. et al. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 4, p. 467-477, 2007.

NASCI, R.S. et al. *West Nile virus* isolates from mosquitoes in New York and New Jersey, 1999. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 626-630, 2001.

NASH, D. et al. The outbreak of *West Nile virus* infection in the New York City area in 1999. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 24, p. 1807-1814, 2001.

NAVARRO, J.M. et al. Meningitis by Toscana virus in Spain: clinical description of 17 cases. **Medicina Clínica**, v. 122, p. 420-422, 2004.

NEGRINI, B.; KELLEHER, K.J.; WALD, E.R. Cerebrospinal Fluid Findings in Aseptic Versus Bacterial Meningitis. **Pediatrics**, v. 105, n. 02, p. 316-319, 2000.

NIGROVIC, L.E.; CHIANG, V.W. Cost analysis of enteroviral polymerase chain reaction in infants with fever and cerebrospinal fluid pleocytosis. **Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine**, v. 154, n. 8, p. 817-821, 2000.

NIGROVIC, L.E.; MALLEY, R.; KUPPERMANN, N. Cerebrospinal fluid pleocytosis in children in the era of bacterial conjugate vaccines: distinguishing the child with bacterial and aseptic meningitis. **Pediatric Emergency Care**, v. 25, n. 2, p. 112-117, 2009.

NIX, W.A.; OBERSTE, M.S.; PALLANSCH, M.A. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2698-2704, 2006.

NOWAK, D.A.; BOEHMER, R.; FUCHS, H.H. A retrospective clinical, laboratory and outcome analysis in 43 cases of acute aseptic meningitis. **European Journal of Neurology**, v. 10, n. 3, p. 271-280, 2003.

OBERSTE, M.S.; MAHER, K.; FLEMISTER, M.R.; MARCHETTI, G.; KILPATRICK, D.R.; PALLANSCH, M.A. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable Enteroviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1170-1174, 2000.

OBERSTE, M.S. et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): Genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 12, p. 3928–3933, 1999.

OBERSTE, M.S. et al. Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species Human Enterovirus A. **Journal of General Virology**, v. 86, n. 2, p. 445-451, 2005.

OBERSTE, M.S. et al. Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 1, p. 119-128, 2006.

OBERSTE, M.S. et al. Molecular identification and characterization of two proposed new Enterovirus serotypes, EV73 and EV 74. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 11, p. 3205-3212, 2004.

OBERSTE, M.S. et al. Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed Enterovirus 73 serotype **Journal of General Virology**, v. 82, n. 2, p. 409-416, 2001.

O'LEARY, D.R. et al. The epidemic of West Nile virus in the United States, 2002. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 4, n. 1, p. 61-70, 2004.

OOI, M.H. et al. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. **Lancet Neurology**, v. 9, n. 11, p. 1097–1105, 2010.

- PACHECO, S.J.B. **Detecção de vírus em pacientes com meningite e/ou encefalite aguda: avaliação clínica e prognóstico.** 1999. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.
- PAGE, R.D.M.; HOLMES, E.C. **Molecular Evolution - A phylogenetic approach.** Oxford: Ed. Blackwell Science Publishing, 1998. 346p.
- PAISLEY, J.E. et al. *West Nile* virus infection among pregnant women in a northern Colorado community, 2003 to 2004. **Pediatrics**, v. 117, p. 814-820, 2006.
- PALACIOS, G. et al. Molecular epidemiology of echovirus 30: temporal circulation and prevalence of single lineages. **Journal of Virology**, v. 76, n. 10, p. 4940-4949, 2002.
- PALLANSCH, M.A.; ROOS, R.P. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: KNIPE, D.M. et al. **Fields Virology**. 4<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 723-775.
- PALMEIRA, G. Epidemiologia. In: ROZENFELD, S. **Fundamentos da Vigilância Sanitária.** Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2000. p. 135-194.
- PAPA, A. et al. Molecular epidemiology of Echovirus 6 in Greece. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 28, n. 6, p. 683-687, 2009.
- PASTORINO, B. et al. Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. **Antiviral Research**, v. 87, n. 3, p. 281-294, 2010.
- PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 467-474, 2011.
- PINTO JUNIOR, V.L. et al. Description of a widespread outbreak of aseptic meningitis due to echovirus 30 in Rio de Janeiro state, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 367-370, 2009.
- PIQUEUR, M.A. et al. Improvement of a real-time RT-PCR assay for the detection of enterovirus RNA. **Virology Journal** v. 6, n. 95, p. 1-3, 2009.
- POST-POLIO NETWORK HOME PAGE. **Ilustrações de enterovírus.** Disponível em: <<http://www.post-polionetwork.org.au>>. Acesso em 03 dez. 2011.
- PROBER, C.G. Infections of the central nervous system. In: BEHRMANN, R.E.; KLEIGMAN, R.M.; JENSON, H.B. **Textbook of Pediatrics**. 16<sup>a</sup> edição. Philadelphia: Ed. WB Saunders Co, 2000. p. 713-716.
- RACANIELLO, V.R. *Picornaviridae*: the viruses and their replication. In: KNIPE, D.M. et al. **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 685-722.
- RAHIMI, P. et al. Direct identification of non-polio enteroviruses in residual paralysis cases by analysis of VP1 sequences. **Journal of Clinical Virology**, v. 45, n. 2, p. 139-141, 2009.



- RAMERS, C. et al. Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management. **Journal of the American Medical Association**, v. 283, n. 20, p. 2680-2685, 2000.
- RE, V. et al. Reliable detection of *St. Louis encephalitis virus* by RT-nested PCR. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 26, n. 1, p. 10-15, 2008.
- RHOADES, R.E. et al. Enterovirus infections of the central nervous system. **Virology**, v. 411, n. 2, p. 288-305, 2011.
- ROCCO, I.M. et al. *St. Louis encephalitis virus*: First isolation from a human in São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 5, p. 281-285, 2005.
- ROMANO-LIEBER, N.S.; IVERSSON, L.B. Inquérito soropidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 236-242, 2000.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 04, p. 406-425, 1987.
- SANTOS, A.P. et al. RT-PCR based analysis of cell culture negative stools samples from poliomyelitis suspected cases. **Journal of Clinical Virology**, v. 23, p. 149-152, 2002.
- SAVOLAINEN, C. et al. Molecular epidemiology of echovirus 30 in Europe: succession of dominant sublineages within a single major genotype. **Archives of Virology**, v. 146, p. 521-537, 2001.
- SCARAMOZZINO, N. et al. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1922-1927, 2001.
- SHOJA, Z.O. et al. Detection of enteroviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in cell culture negative stool specimens of patients with acute flaccid paralysis. **Journal of Virological Methods**, v. 142, n. 1, p. 95-97, 2007.
- SILVA, H.R. et al. Aseptic meningitis syndrome due to Enterovirus and *Leptospira* sp in children of Salvador, Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 2, p. 159-165, 2002.
- SIMMONDS, P. Recombination and selection in the evolution of picornaviruses and other mammalian positive-stranded RNA viruses. **Journal of Virology**, v. 80, p. 11124-11140, 2006.
- SOARES, C.N. et al. Is West Nile virus a potential cause of central nervous system infection in Brazil? **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 68, n. 5, p. 761-763, 2010.
- SPINSANTI, L.I. et al. Human outbreak of *St. Louis encephalitis* detected in Argentina, 2005. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, n. 1, p. 27-33, 2008.

- TAVAKOLI, N.P. et al. Detection and typing of enteroviruses from CSF specimens from patients diagnosed with meningitis/encephalitis. **Journal of Clinical Virology**, v. 43, n. 2, p. 207-211, 2008.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 3ª edição. São Paulo: Ed. Atheneu, 2001. 1032 p.
- TEIXEIRA, C.F.; PAIM, J.S.; VILLASBÔAS, A.L. SUS, Modelos Assistenciais e Vigilância da Saúde. In: ROZENFELD, S. **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2000. p. 49-60.
- THOELLEN, I. et al. Molecular typing and epidemiology of Enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. **Journal of Medical Virology**, v. 70, n. 3, p. 420-429, 2003.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.
- TRALLERO, G. et al. Enteroviruses in Spain over the decade 1998-2007: virological and epidemiological studies. **Journal of Clinical Virology**, v. 47, n. 2, p. 170-176, 2010.
- TRALLERO, G. et al. Enterovirus in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988-97). **Epidemiology and Infection**, v. 124, p. 497-506, 2000.
- VAN DOORNUM, G.J. et al. Development and implementation of real-time nucleic acid amplification for the detection of enterovirus infections in comparison to rapid culture of various clinical specimens. **Journal of Medical Virology**, v. 79, p. 1868-1876, 2007.
- VERSTREPEN, W.A.; BRUYNSEELS, P.; MERTENS, A.H. Evaluation of a rapid real-time RT-PCR assay for detection of Enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens. **Journal of Clinical Virology**, v. 25, n. 1, p. s39-43, 2002.
- VERSTREPEN, W.A. et al. Rapid detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens with a novel single-tube realtime reverse transcription-PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 4093-4096, 2001.
- VIALLO, A. et al. Meningitis in adult patients with a negative direct cerebrospinal fluid examination: value of cytochemical markers for differential diagnosis. **Critical Care**, v. 15, n. 3, p. 136, 2011.
- WEN JIANG GROUP HOME PAGE. **Ilustração de flavivírus**. Disponível em: <<http://jiang.bio.purdue.edu/index.php>>. Acesso em 01 nov. 2010.
- WHO. **Polio Laboratory Manual**. 4ª edição. Geneva: Ed. WHO Document Production Services, 2004. 129 p.
- ZEINAD, A.K. et al. Vírus do Nilo ocidental: Nova ameaça à segurança transfusional? **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 2, p. 114-121, 2004.

**ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO IPEC / FIOCRUZ**

Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



Comitê de Ética em Pesquisa

**PARECER CONSUBSTANCIADO – 19/2009**

Protocolo 0030.0.009.000-09

**1. Identificação:****Título do Projeto:** “Meningites e Encefalites a Líquor Claro (Assépticas): Pesquisa de Agentes Etiológicos Virais, Bacterianos e Fúngicos”.**Pesquisador Responsável:** Dr. Edson Elias da Silva (IOC).**Doutoranda:** Gina Pares Lima dos Santos (INCQS).**Instituição Responsável:** Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ.**Data de Apresentação ao CEP:** 03/06/2009.**2. Sumário:**

O principal objetivo deste projeto é a determinação da etiologia de casos de meningite asséptica através da implementação e padronização de um diagnóstico mais amplo. As amostras clínicas utilizadas (LCRs) serão provenientes de pacientes de várias localidades do Brasil apresentando meningite asséptica, entre os anos de 2007 e 2008. Estas serão submetidas à pesquisa de diferentes agentes etiológicos, pelas técnicas de PCR, RT-PCR e Multiplex-PCR, após extração dos materiais genéticos potenciais (virais, bacterianos e fúngicos), colaborando com a Coordenação de Vigilância de Doenças de Transmissão Respiratória e Imunopreveníveis, da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde (SVS/MS). As amostras do estado do Rio de Janeiro serão recebidas pelo Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião (IEISS). Até o mês de maio de 2009, foram selecionadas 426 amostras provenientes do Laboratório de Enterovírus do Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ e 75 do IEISS.

**3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).**

Projeto com delineamento adequado. O Laboratório de Enterovírus (IOC/FIOCRUZ), por ser Referência para o Ministério da Saúde em Meningites Virais, recebe amostras de LCR, bem como as respectivas fichas, dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs) e tem a responsabilidade de identificar os Enterovírus presentes nestas amostras e enviar o resultado ao Ministério da Saúde. Dessa forma, o Laboratório não realiza a coleta das amostras clínicas e não tem contato com o paciente, apenas com sua(s) amostra(s) clínica(s), não sendo possível, portanto, a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Assim sendo, foi elaborado um Termo de Compromisso e Responsabilidade, garantindo a confidencialidade e a privacidade dos indivíduos, bem como a responsabilidade do pesquisador frente aos dados gerados com o estudo e publicação de resultados. As fontes de fomento para a realização deste projeto são: CAPES - Bolsa de Doutorado concedida à aluna; FIOCRUZ - Verba do Instituto Oswaldo Cruz e CGLAB (MS) – Coordenação Geral dos Laboratórios Centrais de saúde Pública do Ministério da Saúde.

**4. Diligências:**

Não houve.

"Meningites e Encefalites a Líquor Claro (Assépticas): Pesquisa de Agentes Etiológicos Virais, Bacterianos e Fúngicos".

5. Parecer: APROVADO.

Data da reunião: 13 de julho de 2009.

Assinatura do Coordenador:



Dr.<sup>a</sup> Léa Camillo-Coura  
Coordenadora do Comitê  
de Ética em Pesquisa  
IPEC / FIOCRUZ

ANEXO B – ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO NO *JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY*

*Journal of Medical Virology* 83:2164–2171 (2011)

## Genetic Diversity of Echovirus 30 Involved in Aseptic Meningitis Cases in Brazil (1998–2008)

Gina Peres Lima dos Santos,<sup>1</sup> Eliane Veiga da Costa,<sup>1</sup> Fernando Neto Tavares,<sup>1</sup> Luciana Jesus da Costa,<sup>2</sup> and Edson Elias da Silva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Enterovirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute/Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Genetics and Immunology of Viral Infections, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Aseptic meningitis is one of the most common neurological disorders caused by enteroviruses. Among them, Echovirus 30 (E30) is described as the main etiological agent of many outbreaks and sporadic cases. This study investigated the genomic variability of E30 isolated from the cerebrospinal fluid (CSF) of aseptic meningitis cases that occurred from 1998 to 2008 in Brazil. Over a 10-year period (1998–2008), 302 non-polio enteroviruses were isolated, of which 177 were identified as E30 (58.6%). Phylogenetic analysis of the complete VP1 gene (876 nt) of 48 E30 isolates was performed and compared with additional Brazilian and foreign strains. E30 VP1 sequences segregated into three distinct major groups and seven subgroups, which were linked to the isolation year. In general, sequence divergence among E30 strains ranged from 0.2% to 13.8%. A common direct ancestor for this set of E30 strains was not defined. Brazilian isolates from Group I were related genetically to a 1997 USA isolate and both may have a common origin. Group III representatives showed close relationship to the 2007 Argentinean isolates. The present results complement existing data on the molecular characterization and genetic variability of E30 and may contribute to the understanding of the epidemiology of aseptic meningitis in the region. *J. Med. Virol.* 83: 2164–2171, 2011. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

**KEY WORDS:** Echovirus 30; aseptic meningitis; cerebrospinal fluid; nucleotide sequencing; phylogenetic analysis

### INTRODUCTION

Aseptic meningitis, acute flaccid paralysis, and encephalitis are clinical disorders caused by enteroviruses in humans. Although most cases are

asymptomatic, high morbidity rates present primarily in children and severe infections may result in serious sequelae [Pallansch and Roos, 2001].

Enteroviruses consist of small, positive-stranded RNA viruses belonging to the family *Picornaviridae*. Based on the genetic characteristics of the VP1 capsid gene, these viruses have been classified as human enterovirus species HEV-A, HEV-B, HEV-C, and HEV-D [Stanway et al., 2005].

Many outbreaks of aseptic meningitis have been described in several countries with enteroviruses as the etiological agents. In addition to causing outbreaks, aseptic meningitis can present as sporadic cases (SC), keeping active the circulation of the viral serotypes involved in these cases [Thoenen et al., 2003; Kmetzsch et al., 2006; Grenón et al., 2008; Miranda et al., 2008; Tavakoli et al., 2008; Papa et al., 2009]. Detection and typing of the enterovirus involved in clinical disorders is valuable in relating the serotypes to these diseases and contributes to their surveillance [Tavakoli et al., 2008].

Echovirus (Enteric Cytopathogenic Human Orphan virus) serotype 30 is a member of the HEV-B species; this species includes all other echoviruses, Coxsackie B viruses, among others. Echovirus 30 (E30) is one of

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Public Health Laboratories Coordination of Brazilian Ministry of Health (CGLAB/SVS,MS); Grant sponsor: Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES); Grant sponsor: National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ).

Virus nomenclature: Order *Picornavirales*, Family *Picornaviridae*, Genus *Enterovirus*, Human Enterovirus B, Echovirus serotype 30.

The authors declare that there are no conflicts of interest.

\*Correspondence to: Edson Elias da Silva, Enterovirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute/Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: edson@ioc.fiocruz.br

Accepted 11 August 2011

DOI 10.1002/jmv.22235

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

the most commonly isolated echoviruses and has often been associated with aseptic meningitis, responsible for many of the outbreaks and sporadic cases worldwide throughout history [Oberste et al., 1999; Trallero et al., 2000; Savolainen et al., 2001; Bailly et al., 2002; Dos Santos et al., 2006; Cabrerizo et al., 2008; Castro et al., 2009; Hayashi et al., 2009]. Surveillance of aseptic meningitis and its etiological agents is essential, considering its epidemic potential.

To elucidate the genetic variability and relationship of E30 isolated from cerebrospinal fluid (CSF) of aseptic meningitis cases that occurred in Brazil over a period of 10 years (1998–2008), sequences of complete VP1 gene of E30 were determined and phylogenetically analyzed. These sequences were also compared with Bastianni E30 prototype strain (isolated in 1958) and with complete VP1 sequences of E30, isolated worldwide, temporally associated to the period of study.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and Clinical Specimens

The specimens used in this study were CSF of aseptic meningitis cases. From December 1998 to December 2008, 3,186 CSF specimens were received at the Enterovirus Laboratory from the following Brazilian regions: Northeast (Bahia, Pernambuco, and Piauí states), West-Central (Distrito Federal), Southeast (Espírito Santo, Minas Gerais, and Rio de Janeiro states), and South (Paraná and Rio Grande do Sul).

All experiments were performed in compliance with the relevant laws and institutional guidelines and in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki. The institutional committee CEP-IPEC/FIOCRUZ approved the experiments.

### Virus Isolation

The continuous cell lineages RD and HEp2 were used for enterovirus isolation, as recommended by the World Health Organization [WHO, 2004].

### Molecular Typing of Non-Polio Enterovirus (NPEV)

All isolated NPEV were identified initially by VP1 partial sequencing [Dos Santos et al., 2006], followed by sequence comparisons using the BLAST tool [Altschul et al., 1990]. Among them, 48 E30 isolates were selected for phylogenetic analysis. These isolates were chosen as representative of the outbreaks and sporadic cases that occurred from 1998 to 2008.

### E30 Complete VP1 Gene Sequencing

Complete VP1 gene sequences were obtained from 48 E30 isolates. Information on these strains are

shown in Table I. PCR amplification after cDNA synthesis was performed with primers 008 (GCR-TGCAATGAYTTCTCWGT; nt 2411–2430) and 011 (GCICGAYTGITGICCRAA; nt 3408–3389), which hybridize in the VP3 and 2A genes, respectively, flanking the VP1 gene [Oberste et al., 1999].

Cycle-sequencing reactions were performed on both strands of purified PCR products, using primers 008 and 011 separately. SeqMan software from the DNASTar package was used to generate contigs of the complete VP1 gene (876 nt consensus sequences) [Burland, 2000].

### Phylogenetic Analysis

Complete E30 VP1 sequences from this study were analyzed and compared with the E30 prototype strain Bastianni (USA isolate from 1958) as well as the Frater (Scotland, 1959) and Giles (USA, 1960) strains. In addition, five Brazilian E30 isolates from Pará State [Castro et al., 2009] and 57 sequences from contemporary E30 strains isolated in different countries, among complete VP1 sequences available at the GenBank, were also included.

Nucleotide and amino acid alignments of the E30 VP1 sequences and sequence edition were obtained using the Clustal-X [Thompson et al., 1997] and Bio-Edit 7.0.9 [Hall, 1999] programs.

Phylogenetic reconstruction was obtained with the MEGA 4.0 program [Kumar et al., 2001] using the Neighbor-Joining reconstruction method [Saitou and Nei, 1987]. Genetic distances were estimated using the Kimura-Two parameter model [Kimura, 1980]. Robustness of the branches in the phylogenetic tree was statistically evaluated by 1,000 bootstrap replicates [Felsenstein, 1985].

### Nucleotide Sequences Accession Number

E30 VP1 sequences determined in this study are available in GenBank Database. Accession numbers are in Table I.

## RESULTS

### Enterovirus Isolation and Molecular Identification

From 1998 to 2008, 302 NPEV from 3,186 CSF specimens (9.4%) originating from 6 outbreaks (Table II) and 51 sporadic cases were isolated using RD and/or HEp2 cells. Altogether, 177 isolates were identified as E30 using partial VP1 sequences (58.6% of 302 NPEV). E30 was the most prevalent serotype of enterovirus isolated from sporadic cases and outbreaks during the years comprising the present study.

### Phylogenetic Clustering of E30 Isolates

To study the genetic diversity and possible relationships of E30 circulating in Brazil from 1998 to 2008,

TABLE I. Information of E30 Isolates Analyzed in This Study

Isolate identification	Year of isolation	Locality*	Epidemiological origin	% of Nucleotide similarity with Bastianni strain (876 nt)	% of Amino acid similarity with Bastianni strain (292 aa)	Accession number
01	1998	PR	Outbreak 1	83.5	92.4	HQ152879
02	1998	PR	Outbreak 1	83.5	92.8	HQ152880
03	1998	PR	Outbreak 1	83.0	91.4	HQ152881
04	1998	PR	Outbreak 1	83.5	92.8	HQ152882
05	1998	PR	Outbreak 1	83.1	91.1	HQ152883
06	1999	PR	Sporadic case	82.6	91.1	HQ152884
07	2001	PR	Outbreak 2	82.8	91.1	HQ152885
08	2001	PR	Outbreak 2	83.2	91.4	HQ152886
09	2001	PR	Outbreak 2	83.8	92.1	HQ152887
10	2001	PR	Outbreak 2	83.9	91.8	HQ152888
11	2001	PR	Sporadic case	83.5	91.4	HQ152889
12	2001	PR	Outbreak 3	83.3	91.4	HQ152890
13	2001	PR	Outbreak 3	82.9	91.1	HQ152891
14	2001	PR	Outbreak 3	82.8	92.1	HQ152892
15	2001	PR	Outbreak 3	83.5	90.7	HQ152893
16	2002	RJ	Sporadic case	82.7	92.4	HQ152894
17	2002	RJ	Sporadic case	83.4	92.8	HQ152895
18	2002	RJ	Sporadic case	83.0	92.1	HQ152896
19	2002	PE	Outbreak 4	82.6	91.4	HQ152897
20	2002	PE	Outbreak 4	82.8	91.8	HQ152898
21	2002	PE	Outbreak 4	82.6	91.8	HQ152899
22	2002	PE	Outbreak 4	83.0	92.1	HQ152900
23	2002	PE	Outbreak 4	82.7	91.8	HQ152901
24	2002	PE	Outbreak 4	82.8	92.1	HQ152902
25	2003	PR	Sporadic case	83.0	91.8	HQ152903
26	2005	RJ	Outbreak 5	82.6	91.8	HQ152904
27	2005	RJ	Outbreak 5	82.2	91.1	HQ152905
28	2005	RJ	Outbreak 5	82.4	91.8	HQ152906
29	2005	RJ	Outbreak 5	82.5	91.4	HQ152907
30	2005	RJ	Outbreak 5	82.6	92.5	HQ152908
31	2005	RJ	Outbreak 5	82.6	92.1	HQ152909
32	2005	RJ	Outbreak 5	82.0	91.4	HQ152910
33	2005	RJ	Outbreak 5	82.4	91.8	HQ152911
34	2005	PR	Sporadic case	82.1	91.1	HQ152912
35	2006	RS	Sporadic case	80.8	89.7	HQ152913
36	2006	RS	Sporadic case	81.3	90.7	HQ152914
37	2006	RS	Sporadic case	81.8	91.8	HQ152915
38	2007	DF	Sporadic case	82.0	90.4	HQ152916
39	2007	BA	Sporadic case	80.8	90.8	HQ152917
40	2007	BA	Sporadic case	82.5	92.1	HQ152918
41	2008	RJ	Sporadic case	81.2	91.4	HQ152919
42	2008	RJ	Sporadic case	81.0	90.4	HQ152920
43	2008	RJ	Outbreak 6	80.5	91.1	HQ152921
44	2008	RJ	Outbreak 6	80.7	90.8	HQ152922
45	2008	RJ	Outbreak 6	81.9	91.4	HQ152923
46	2008	RJ	Outbreak 6	81.7	91.1	HQ152924
47	2008	RJ	Outbreak 6	81.7	91.1	HQ152925
48	2008	RJ	Outbreak 6	81.2	91.4	HQ152926

\*States BA, Bahia; DF, Distrito Federal; PE, Pernambuco; PR, Paraná; RJ, Rio de Janeiro; RS, Rio Grande do Sul.

48 isolates were sequenced and characterized by phylogenetic analysis of the complete VP1 (876 nt). E30 VP1 sequences segregated into three distinct major groups (I, II, and III) and seven subgroups (Ia–Ic and IIa–IIc) (Fig. 1). Group I included 24 sequences of E30 isolated in both outbreaks and sporadic cases in 1998, 1999, 2001, and 2002. This group was genetically homogeneous, presenting 0.2–6.1% nucleotide divergence. Clustered in Group II were 22 E30 isolates from outbreaks and sporadic cases from 2003 to 2008, presenting 0.6–8.6% nucleotide divergence. Group III consisted of two E30 isolates from sporadic cases in

2006. Bastianni prototype strain and Frater strain clustered together.

In general, nucleotide sequence divergence in pairwise comparisons among Brazilian E30 isolates ranged from 0.2% to 13.8%. Compared with the prototype strain, the genetic divergence increased to 16.1–19.5%. All Brazilian isolates characterized in this study grouped monophyletically.

The most divergent isolates were 36-SC-RS-06 and 37-SC-RS-06 (Group III), which differed from all other isolates by 10.3–13.8%. Isolate 35-SC-RS-06 did not cluster with any other isolate.

TABLE II. Epidemiological Characteristics of Six Echovirus 30 Meningitis Outbreaks That Occurred in Brazil From 1998 to 2008

	Outbreak 1	Outbreak 2	Outbreak 3	Outbreak 4	Outbreak 5	Outbreak 6
Brazilian State	Paraná State	Paraná State	Paraná State	Pernambuco State	Rio de Janeiro State	Rio de Janeiro State
Probable Period	December 1998 to February 1999	December 2000 to January 2001	October to November 2001	April 2002 to June 2002	March to April 2005	October 2008
Total of analyzed specimens (CSF)	101	48	56	70	116	18
Total of specimens with E30 isolating (isolation rate)	35 (34.6%)	15 (31.2%)	21 (37.5%)	26 (37.1%)	22 (18.9%)	7 (38.8%)
Nucleotide identity (%) among isolates	97.3–99.3	98.0–99.0	96.9–98.6	98.6–99.8	95.0–99.3	94.5–99.4
Amino acid identity (%) among isolates	95.5–99.6	97.9–99.6	96.9–98.2	97.6–99.6	96.2–100	96.9–99.3

Subgroups within Groups I and II were tightly linked to the year of isolation, as a high genetic relationship among isolates of the same outbreak or sporadic cases of the same year was evident. Divergence in the E30 sequences of the 1998–1999 isolates was 0.7–3.0%. In 2001, isolates diverged 0.8–3.6%. In 2002, genetic divergences in VP1 sequences varied from 0.2% to 2.6%; in 2008, isolates diverged 0.6–5.5%.

An E30 isolate from a 1999 sporadic case (06-SC-PR-99) and all isolates from a 1998 outbreak occurred in a single geographic area (Paraná State) and clustered in a single subgroup in Group I (Ib). E30 VP1 sequences of 2001, 2002, and 2008, from both sporadic cases and outbreaks, clustered together in three respective subgroups of Groups I and II (Ic, Ia, and IId). Similar behavior was evident in E30 strains of 2005, except for isolates 27-Outbreak 5-RJ-05 and 34-SC-PR-05, which shared 3.7–5.9% nucleotide divergence when compared with other 2005 isolates.

No outbreaks were recorded in the time interval between 2003 and 2004, whereas one E30 sporadic case (25-SC-PR-03) was identified.

All 48 E30 strains were compared with additional Brazilian E30 strains isolated in 2005 and 2006 from Pará State [Castro et al., 2009]. This comparison was performed using partial sequences of the VP1 gene (349 nt). Isolate 39-SC-BA-07, a 2007 E30 strain from Bahia State sporadic case, was genetically related to the Pará E30 strains (3.2–4.6% nucleotide divergence). These strains clustered together in Group II (see Supplemental Material 1).

#### Comparison Between Brazilian E30 Isolates and Worldwide E30 Sequences

Phylogenetic analysis included comparisons of the VP1 sequences from the 48 Brazilian E30 isolates characterized in this study with VP1 sequences from circulating isolates during the study period (1998–2008), representative of other countries. Groups I, II,

and III were compared with 46 sequences from E30 isolates collected from 1994 to 2008 (Fig. 2). Comparisons with South American isolates were performed separately, using partial E30 VP1 sequences from Argentina (420 nt).

When compared with E30 isolates circulating in other countries, Brazilian isolates from both Groups I and II remained as monophyletic groups. Interestingly, a 1997 USA E30 isolate [Oberste et al., 1999] was genetically related to the isolates from Group I. This E30 isolate diverged from Group I sequences 2.4–5.7%.

Analysis of the partial VP1 sequences demonstrated that two 2007 Argentinean isolates presented as closely related to isolates of Group III (5.8–6.0% genetic divergence) (see Supplemental Material 2).

#### Amino Acid Variability of E30 VP1 Sequences

E30 sequences obtained in this study presented at least 89.7% of similarity in VP1 amino acid sequences (292 aa) with the Bastianni prototype strain. Brazilian E30 isolates had a high degree of conservation in the VP1 amino acid sequences, with similarities ranging from 92.5% to 100% (Table I).

#### DISCUSSION

A molecular study of genetic variability was performed to establish associations among complete VP1 gene sequences of E30 strains isolated from the CSF of aseptic meningitis cases that occurred in Brazil between 1998 and 2008. A total of 302 NPEV were isolated in cell cultures during this period. Most of the isolates ( $n = 177$ , 58.6%) were identified as E30. These isolates were from 6 outbreaks and 51 sporadic cases that occurred in 9 Brazilian states.

The frequent presence of enteroviruses in aseptic meningitis cases may be influenced by the efficiency of transmission [Oberste et al., 1999] and dissemination of these agents in to the community. A continuous circulation of E30 in Brazil has been observed in recent years. For instance, between 1998 and 2008



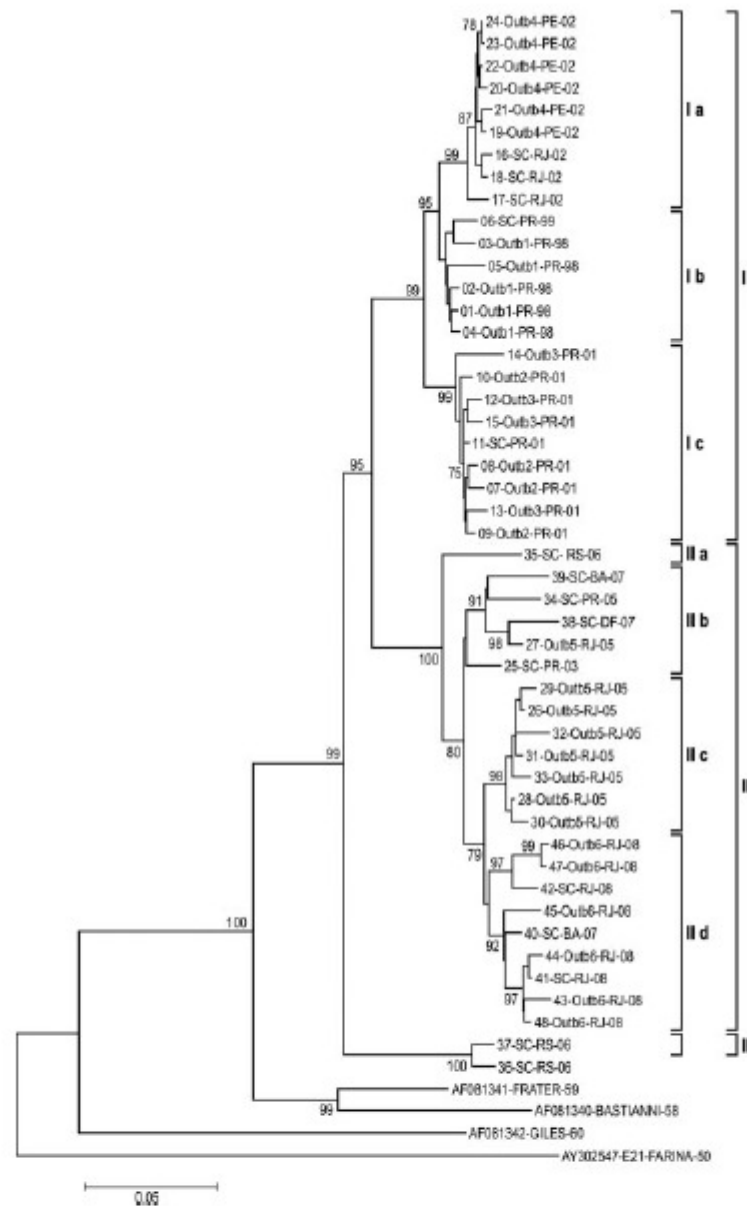
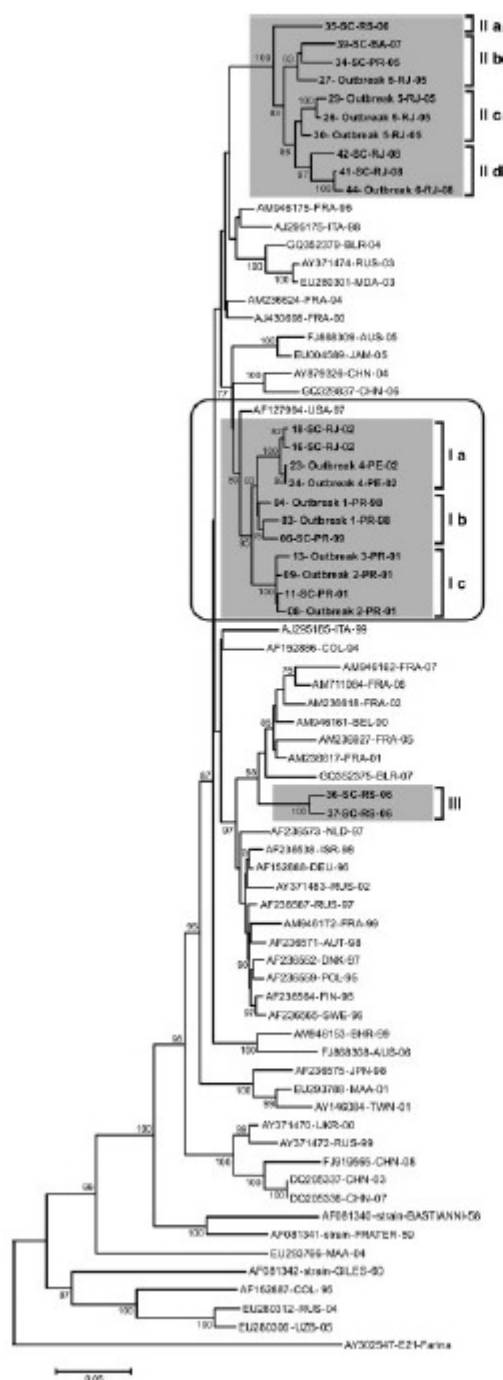


Fig. 1. Phylogenetic analysis of E30 strains based on VP1 gene nucleotide sequences (876 nt) showing the genetic relationships between 48 Brazilian E30 strains isolated between 1998 and 2008, as well as the Bastianni prototype strain and Frater and Giles strains. The phylogenetic tree was constructed by the Neighbor-Joining method (MEGA 4.0 program). Genetic distances were estimated with the Kimura-Two parameters model. The numbers at the branching nodes are the percentage of 1,000 bootstrap replicates (percentages higher than 75% are shown). The E21 Farina prototype strain was included as an outgroup. E30 isolates were identified by number; a code differentiating outbreaks (Outbreak 1–6) from sporadic cases origin of isolate (SC); locality (see Table I for the abbreviations of the states); and the year of isolation (last two numbers of year). E30 prototype strain and Frater and Giles strain sequences were retrieved from the GenBank and identified by the accession number, name of strain and year of isolation. Major genetic groups and subgroups are indicated.

several sporadic cases and at least seven aseptic meningitis outbreaks with enteroviral etiology were identified. Six of them were caused by E30 [Dos Santos et al., 2006; Kmetzsch et al., 2006].



Phylogenetic relationships inferred from comparisons of 48 E30 VP1 sequences from Brazilian isolates from 1998 to 2008 revealed the existence of two main distinct genetic groups that were temporally segregated and one group with two highly divergent sequences from sporadic cases from a same year. Sequences clustering in the two main groups were further classified within distinct subgroups. Segregation of sequences within distinct subgroups was similarly related to the time of the occurrence of the aseptic meningitis cases, clustering together isolates from outbreaks and sporadic cases from different geographic areas. These data suggest distinct introductions of E30 in the Brazilian territory causing both outbreaks and sporadic cases of aseptic meningitis.

The VP1 gene was chosen due to its high genetic variation and relevance for enteroviruses immunity. VP1 is used in molecular enteroviruses identification, as well as in phylogenetic studies [Oberste et al., 1999; Künkel and Schreier, 2000; Savolainen et al., 2001; Bailly et al., 2002, 2009; Palacios et al., 2002; Racaniello, 2007]. With the widespread application of phylogenetic analysis, it is feasible to study genetic diversity, with subdivision in subgroups or lineages and tracing genetic ties between viral strains [Page and Holmes, 1998]. Genetic relationships among E30 strains from Brazil and the Bastianni prototype strain established in this study concur with reports from other countries [Bailly et al., 2000b, 2002; Mirand et al., 2006]. Divergence in pairwise comparisons among E30 strains ranged from 0.2% to 13.8%. Similar results were described previously [Oberste et al., 1999; Caro et al., 2001; Savolainen et al., 2001].

Subgroups of Groups I and II were related to the year of isolation. This was confirmed by the low values of divergences between the isolates in 2001, 2002, and 2008. These results demonstrating high genetic similarities among E30 isolates within the same outbreak are consistent with the literature [Gjoen et al., 1996; Bailly et al., 2009]. Isolates from 1998 and 1999 clustered in a single subgroup within Group I (Ib) and may have a common ancestor.

The results suggest that a simultaneous circulation of at least two different E30 variants in Brazil

Fig. 2. Phylogenetic analysis of E30 strains based on VP1 nucleotide sequences (876 nt) showing genetic relationships between 48 Brazilian E30 strains isolated between 1998 and 2008 (Groups I, II, and III), as well as the Bastianni prototype strain, the Frater and Giles strains and 46 isolates from the following countries: Australia (AUS), Austria (AUT), Bahrain (BHR), Belarus (BLR), Belgium (BEL), China (CHN), Colombia (COL), Denmark (DNK), Finland (FIN), France (FRA), Germany (DEU), Israel (ISR), Italy (ITA), Jamaica (JAM), Japan (JPN), Malaysia (MAA), Moldavia (MDA), Netherlands (NLD), Poland (POL), Russia (RUS), Sweden (SWE), Taiwan (TWN), Ukraine (UKR), United States of America (USA), and Uzbekistan (UZB). Phylogenetic reconstruction parameters and identification of E30 isolates were similar to those detailed in Figure 1. The E21 Farina prototype strain was included as an outgroup. E30 sequences retrieved from the GenBank were identified by the accession number, international three-letter country code and year of isolation.

occurred in 2005, given that isolate 34-SC-PR-05 did not cluster with other isolates. The geographical origin of the isolates supports the hypothesis of the co-circulating isolates in 2005: isolate 34 was from a sporadic case from the Paraná State, whereas the remaining isolates were from an outbreak that occurred in the Rio de Janeiro State. Sporadic cases are more likely to have independent origins than outbreaks.

Three strains (35-SC-RS-06, 36-SC-RS-06, and 37-SC-RS-06) from sporadic cases that occurred in the Rio Grande do Sul State in 2006 were substantially different from other E30 isolates. They appear to have been introduced independently in Brazil.

The clustering pattern of 39-SC-BA-07, an isolate from the Bahia State in 2007 and Pará E30 strains clearly suggest a recent common linking ancestor. In general, E30 isolates circulating in the same period are genetically related to each other. Group I cluster persisted for 5 years, whereas Group II persisted for 6 years.

Furthermore, based on the close genetic relationship between sequences, which presented 94–94.2% of nucleotide sequence similarity, and by the geographical proximity between the Rio Grande do Sul State and Argentina, these data also suggest that one of the E30 isolates belonging to Group III may have originated the E30 strains found in Argentina in the following year (2007). Likewise, the high genetic relationship among Group I and the 1997 USA isolate suggests a common origin.

Amino acid variability of the E30 strains demonstrated that they were highly similar to each other (92.5–100% of identity). The amino acid changes and the possible biological relevance have not been investigated. These results agree with existing E30 molecular studies [Oberste et al., 1999; Caro et al., 2001; Savolainen et al., 2001; Castro et al., 2009].

Genetic diversity in enteroviruses is relatively common and is demonstrated by the many distinct serotypes [DeFilippis and Villarreal, 2001; Stanway et al., 2005] and by variations within serotypes, as with E30 [Oberste et al., 1999; Künkel and Schreier, 2000; Savolainen et al., 2001; Bailly et al., 2002]. This serotype has been extensively studied worldwide and results corroborate its genetic variability potential [Künkel and Schreier, 2000; Bailly et al., 2000a, 2009; Savolainen et al., 2001; Palacios et al., 2002; Castro et al., 2009].

Phylogenetic analysis allowed the genetic characterization of 48 E30 VP1 sequences representative of aseptic meningitis cases from almost all Brazilian regions during a 10-year period. The knowledge acquired by this study may have significant relevance for understanding E30 behavior in terms of spread, circulation, transmission, and persistence in susceptible populations. During the progress of this study, a paper reporting the genetic relationship among five E30 isolates using partial VP1 sequences from the Pará State (Northern Brazil) was published [Castro

et al., 2009]; the sequences of these five isolates were included in the analysis.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Enterovirus Laboratory staff (National Reference Centre—IOC/FIOCRUZ) for the excellent technical assistance.

## REFERENCES

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410.
- Bailly JL, Chambon M, Henquell C, Icart J, Peigue-Lafeuille H. 2000a. Genomic variations in echovirus 30 in persistent isolates recovered from a chronically infected immunodeficient child and comparison with the reference strain. *J Clin Microbiol* 38:552–557.
- Bailly JL, Béguet A, Chambon M, Henquell C, Peigue-Lafeuille H. 2000b. Nosocomial transmission of Echovirus 30: Molecular evidence by phylogenetic analysis of the VP1 encoding sequence. *J Clin Microbiol* 38:2889–2892.
- Bailly JL, Brason D, Archimbaud C, Chambon M, Henquell C, Peigue-Lafeuille H. 2002. Genetic diversity of echovirus 30 during a meningitis outbreak demonstrated by direct molecular typing from cerebrospinal fluid. *J Med Virol* 68:558–567.
- Bailly JL, Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, Chambon M, Charbonné F, Traoré O, Peigue-Lafeuille H. 2009. Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50 years: Nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene. *Infect Genet Evol* 9:699–708.
- Burland TG. 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol Biol* 132:71–91.
- Cabrero M, Echevarria JE, González I, De Miguel T, Trallero G. 2008. Molecular epidemiological study of HEV-B enteroviruses involved in the increase in meningitis cases occurred in Spain during 2006. *J Med Virol* 80:1018–1024.
- Caro V, Guillot S, Delpeyroux F, Cminic R. 2001. Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J Gen Virol* 82:79–91.
- Castro CM, Oliveira DS, Macedo O, Lima MJ, Santana MB, Wanzeller AL, Silveira E, Gomes ML. 2009. Echovirus 30 associated with cases of aseptic meningitis in state of Pará, Northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:444–450.
- DeFilippis VR, Villarreal LP. 2001. Virus evolution. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields virology*, 4th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers. pp 353–370.
- Dos Santos GPL, Skraba I, Oliveira D, Lima AA, De Melo MM, Kmetzsch CI, Da Costa EV, Da Silva EE. 2006. Enterovirus meningitis in Brazil, 1998–2003. *J Med Virol* 78:98–104.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.
- Gjoen K, Bruu AL, Orstavik I. 1996. Intratype genome variability of echovirus type 30 in part of the VP4/VP2 coding region. *Arch Virol* 141:901–908.
- Grenón SL, Robledo ML, Von Specht MH, Cisterna DM, Lema CL, Freire MC. 2008. Outbreak of viral meningitis caused by echovirus type 4 in Misiones province. *Rev Argent Microbiol* 40:41–46.
- Hall TA. 1998. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98.
- Hayashi T, Shirayoshi T, Nagano T, Yaoita H, Kogure S, Nariai H, Natsumeda T, Taniuchi M, Sando H, Sato Y. 2009. An outbreak of aseptic meningitis due to echovirus 30 in a high school baseball club—Possible role of severe exercise for a high attack rate. *Intern Med* 48:1767–1771.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120.
- Kmetzsch CI, Balkie EM, Monteiro A, Costa EV, Dos Santos GPL, Da Silva EE. 2006. Echovirus 13 aseptic meningitis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 12:1289–1290.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. MEGA 2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17:1244–1245.

- Künel U, Schreier E. 2000. Genetic variability within the VP1 coding region of echovirus type 30 isolates. *Arch Virol* 145:1455–1464.
- Mirand A, Archimbaud C, Henquell C, Michel Y, Chambon M, Peigue-Lafeuille H, Bailly JL. 2006. Prospective identification of HEV-B enteroviruses during the 2005 outbreak. *J Med Virol* 78:1624–1634.
- Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, Chambon M, Charbonne F, Peigue-Lafeuille H, Bailly JL. 2008. Prospective identification of enteroviruses involved in meningitis in 2006 through direct genotyping in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 46:87–96.
- Oberste MS, Maher K, Kennett ML, Campbell JJ, Carpenter MS, Schnurr D, Pallansch MA. 1999. Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): Genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation. *J Clin Microbiol* 37:3928–3933.
- Page RDM, Holmes EC. 1998. *Molecular Evolution—A phylogenetic approach*, 1st edition. Oxford: Blackwell Science Publishing. 346p.
- Palacios G, Casas I, Cisterna D, Trullero G, Tenorio A, Freire C. 2002. Molecular epidemiology of echovirus 30: Temporal circulation and prevalence of single lineages. *J Virol* 76:4940–4949.
- Pallansch MA, Roos RP. 2001. Enteroviruses: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields virology*, 4th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers. pp 723–775.
- Papa A, Skoura I, Dumaidi K, Spiliopoulou A, Antoniadis A, Frantidou F. 2009. Molecular epidemiology of Echovirus 6 in Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28:683–687.
- Racaniello VR. 2007. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields virology*, 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers. pp 795–838.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425.
- Savolainen C, Hovi T, Mulders MN. 2001. Molecular epidemiology of echovirus 30 in Europe: Succession of dominant sublineages within a single major genotype. *Arch Virol* 146:521–537.
- Stanway G, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypää T, King AMQ, Knowles NJ, Lemon SM, Minor PD, Pallansch MA, Palmberg AC, Skern T. 2005. Family *Picornaviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. *Virus taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Elsevier/Academic Press. pp 757–778.
- Tavakoli NP, Wang H, Nattanmai S, Dupuis M, Fusco H, Hull R. 2008. Detection and typing of enteroviruses from CSF specimens from patients diagnosed with meningitis/encephalitis. *J Clin Virol* 43:207–211.
- Thoelen I, Lemey P, Van Der Donck I, Beuselinck K, Lindberg AM, Van Ranst M. 2003. Molecular typing and epidemiology of Enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. *J Med Virol* 70:420–429.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876–4882.
- Trullero G, Casas I, Tenorio A, Echevarria JE, Castellanos A, Lozano A, Brena PP. 2000. Enterovirus in Spain: Virological and epidemiological studies over 10 years (1988–97). *Epidemiol Infect* 124:497–506.
- WHO. 2004. *Polio Laboratory Manual*. World Health Organization, 4th edition. Geneva: WHO Document Production Services. 129p.

**ANEXO C – ARTIGO CIENTÍFICO A SER SUBMETIDO NO PERIÓDICO MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Running Title: Flavivirus Surveillance in Meningitis

Title: Two molecular approaches for the detection of flaviviruses: the relevance of the surveillance of West Nile virus in aseptic meningitis and meningoencephalitis cases in Brazil

Gina Peres Lima dos Santos, Eliane Veiga da Costa, Edson Elias da Silva<sup>+</sup>

Laboratório de Enterovírus – Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

+ Corresponding Author: edson@ioc.fiocruz.br

Financial Support: SVS/MS, CAPES, CNPq.

**ABSTRACT**

Flaviviruses are some of the etiological agents involved in aseptic meningitis and meningoencephalitis cases. West Nile virus (WNV) is a worldwide emerging flavivirus, commonly involved in outbreaks and epidemics of neuroinvasive diseases. Due to its rapid spread in Americas and ecological conditions, WNV can be already circulating in Brazil, or it can be imported at anytime. Neutralizing antibodies to this virus were recently detected in horses, but its circulation among humans in Brazil is still unclear. In this study the potential etiological role of flaviviruses in aseptic meningitis and meningoencephalitis cases in Brazil was analyzed. Semi-Nested PCR and conventional PCR assays were developed in order to amplifying flavivirus genomic sequences in 208 CSF. The primers designed for both techniques showed to be useful tools to detect flavivirus used as positive controls. In CSF analyzed, no flavivirus was found using both strategies. These findings suggest the absence of viruses such as WNV, JEV and SLEV in the specimens analyzed. With regards to WNV, Brazil seems to remains free of it. Nevertheless, the hypothesis of its silent circulation cannot be excluded. It is intended to continue monitoring and improving techniques for identifying WNV and other flaviviruses in such cases.

**KEYWORDS**

Flavivirus, WNV, Semi-Nested-PCR, PCR, Aseptic Meningitis, CSF.

## INTRODUCTION

Acute viral neuroinvasive infections affect worldwide population in a sporadic, endemic and/or epidemic way, keeping active the viral circulation. The vast majority of these cases are constituted of aseptic meningitis and encephalitis. Non-Polio enteroviruses represent the main etiological agents of aseptic meningitis, being responsible for over 80% of cases in which the etiological agent is identified (Pallansch & Roos 2001).

Besides enteroviruses, flaviviruses are also described as etiological agents of aseptic meningitis and meningoencephalitis (Burke & Monath 2001, Chadwick 2005, Kuwayama et al. 2005, Kopel et al. 2011, Barzon et al. 2009, Feki et al. 2005, Gyure 2009). In terms of mortality and severity of symptoms, aseptic meningitis and meningoencephalitis caused by some flaviviruses and herpesviruses are the most relevant (Chadwick 2005).

There are many reports of cases, outbreaks and epidemics caused by flaviviruses as West Nile virus (WNV) (Julian et al. 2003, Nash et al. 2001, O'Leary et al. 2004) and St. Louis encephalitis virus (SLEV) (Jones et al. 2002, Spinsanti et al. 2008) in Americas. In Brazil, there is a description of cases of meningoencephalitis due to SLEV (Morais Bronzoni et al. 2005).

Flaviviruses are enveloped spherical viruses, belonged to *Flaviviridae* family, *Flavivirus* genus, whose genome consists of positive-sense and single stranded RNA (Burke & Monath 2001). They are maintained in nature by transmission cycles between mosquitoes as vectors and bird as host and reservoir. Transmission to incidental hosts as humans and horses occurs predominantly after a bite from an infected mosquito (Davis et al. 2006). Abundance of mosquitoes of the *Culex* genus, common vectors for flaviviruses, and the intense flow of migratory birds from northern hemisphere to the southern (Rappole et al. 2000) enable tropical regions to massive transmission of these viruses and consequently the diseases they cause.

WNV is included in Japanese Encephalitis Serocomplex, a group of antigenically related flaviviruses also composed by Japanese encephalitis virus (JEV), SLEV and Murray Valley encephalitis virus (MVEV). These viruses share the ability of being neuroinvasives, demanding particular attention (Burke & Monath 2001, Davis et al. 2006).

WNV is widely distributed in Africa, Europe, Australia and Asia (Kramer et al. 2007, Barzon et al. 2009, Feki et al. 2005). Since its introduction to the United States in 1999, WNV has become endemic in North America (Davis et al. 2006) and has been described in many countries of Latin America and Caribbean (Komar & Clark 2006, Morales et al. 2006, Adrián Diaz et al. 2008, Mattar et al. 2005, Bosch et al. 2007).

The confirmatory diagnosis of aseptic meningitis caused by WNV is based on the detection of IgM or viral isolation in Cerebrospinal Fluid (CSF) and/or serum and also on detection of viral nucleic acid in CSF by RT-PCR (Davis et al. 2006).

The isolation of WNV in horses and its serological evidence in birds was already described in Argentina (Morales et al. 2006, Adrián Diaz et al. 2008). In Venezuela and Colombia, seropositivity for WNV was identified in birds and horses (Mattar et al. 2005, Bosch et al. 2007).

In Brazil, to date, there is no confirmation of WNV circulation. However, due to its rapid spread in Americas and taking into account the ecological conditions, the absence of WNV in Brazil is surprising (Chávez & Figueiredo 2006, Figueiredo 2007). Neutralizing antibodies to this virus were recently detected in sera from horses of the Brazilian Pantanal (Pauvolid-Corrêa et al. 2011).

The Enterovirus Laboratory, as reference center for aseptic meningitis cases, receives CSF specimens from many Brazilian states for diagnosis. However, some of these cases remain with unknown etiology.

The present study aims to begin the establishment of an active laboratorial WNV surveillance, describing two PCR-based strategies to detect the presence of flaviviral RNA in CSF from aseptic meningitis and meningoencephalitis cases in an easy and fast way.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients and Clinical Specimens**

In this retrospective study, 208 CSF provenient of aseptic meningitis and meningoencephalitis cases occurred in 2008-2009 were analyzed.

The CSF specimens were received from the following states: Bahia (51 CSF), Rio de Janeiro (33), Paraná (27), Minas Gerais (25), Piauí (19) and Distrito Federal (18). They were previously tested by viral isolation and molecular detection for the presence of Enterovirus and were negative.

### **RNA Extraction and cDNA Synthesis**

Flaviviral RNA potentially present in CSF was extracted with the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) and subjected to cDNA synthesis using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions.

### **Primer Design and Optimization of Amplification**

Semi-Nested-PCR and conventional PCR were developed and optimized towards amplifying specific sequences of WNV and other flaviviruses in CSF specimens.

The primers of both assays were designed to amplify the NS5 gene, which is known to be highly conserved among the flaviviruses. Their nucleotide sequences, locations of hybridization within the viral genomes and the sizes of amplicons are in Table I. Primers sequences were defined based on multiple alignments of flavivirus genomes, including WNV, JEV, SLEV, Dengue Virus (DENV), Yellow Fever Virus (YFV), Ilheus Virus, Bussuquara Virus and Rocio Virus.

The standardization of both techniques involved the optimization of amplification, being tested annealing temperature gradients (42°C to 56°C), variations in the number of cycles (30-35) and different primers concentrations (15 to 150µM). In these tests were used flavivirus samples, scored as positive in routine assays in Flavivirus Laboratory (IOC/FIOCRUZ).

### **Semi-Nested -PCR**

The Semi-Nested-PCR was performed as follows: The first round was carried out using the outer primers F1 and R1; in the second round, were used the same reverse primer R1 and the nested forward primer, F2. The reaction mix consisted of 12,5µl of GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega), 15µM of each primer, 3µl of cDNA and PCR Water (distilled RNase and DNase free Water - Gibco) up to 25µl. Two microliters of amplified product were used as a template in the second round of the reaction. The PCR conditions was identical for both rounds and consisted of an initial denaturation at 95°C for 3 min, 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 52°C for 45 sec, and extension at 70°C for 1 min. A final extension step of 7 min at 70°C was added. Each set of reactions included positive and negative controls. Amplicons were analyzed by electrophoresis in a 10% acrylamide gel stained with ethidium bromide (0.5 mg/ml) and were visualized and scanned in a photo-documentation UV-based system (BioRad).

The samples were also subjected to attempts to reamplification, using 1 µl of the amplified products on the second round in news PCR reactions, using the same primers (R1 and F2) and under the same conditions of the first reactions.

### Conventional PCR

For the Conventional PCR, reaction mix consisted of 12,5µl of GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega), 25µM of primers FlaPCRR and FlaPCRF, 3µl of cDNA and PCR Water up to 25µl. Initial denaturation at 95°C for 3 minutes was followed by 34 cycles of 95°C for 30 sec, 42°C for 45 sec and 70°C for 55 sec; a final extension step of 7 minutes at 70°C was added. Each set of reactions included positive and negative controls. Amplicons were analyzed by electrophoresis in a 10% acrylamide gel stained with ethidium bromide.

The samples were also subjected to attempts to reamplification, using 1 µl of the amplified products in new reactions, using the same primers (FlaPCRR and FlaPCRF) and under the same conditions of the first reactions.

### Confirmation of Flavivirus Detection

Samples presenting bands too nearby the expected size on the acrylamide gel (indeterminate result) in the Semi-Nested and in the conventional PCR were confirmed by nucleotide sequencing, employing the BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems) and the respective PCR primers.

### Ethical Aspects

All experiments were performed in compliance with the relevant laws and institutional guidelines and in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki. The institutional committee CEP-IPEC/ FIOCRUZ approved the experiments.

## RESULTS

The optimal Semi-Nested-PCR conditions were determined, with 52°C of annealing temperature, 35 cycles and 15µM of primers F1, R1 and F2.

For Conventional PCR, optimization of amplification was achieved with 42°C of annealing temperature, 34 cycles and 25µM of each primer (FlaPCRR and FlaPCRF). No nonspecific amplification was detected in the assays.

The primer pairs used in Semi-Nested-PCR as well as in conventional PCR consistently amplified flaviviruses samples used as positive controls of reactions sets, yielding readily detected amplicons in acrylamide gels (Figs. 1 and 2). These primers schemes proved to be suitable for detection of WNV and other flaviviruses.

Of the 208 CSF analyzed using Semi-Nested-PCR, 199 were clearly negative and 9 were indeterminate. Thereafter, Conventional PCR confirmed negative results for 204 CSF, while 4 were indeterminate. There was no change in the results with the attempts to reamplification.

The indeterminate samples were submitted to partial sequencing for confirmation. All sequences obtained resembled to human genome in BLAST comparisons and were considered as negative.

Thus, in CSF specimens provenient of aseptic meningitis and meningoencephalitis cases analyzed, no flavivirus specific nucleic acid was found using both strategies.

## DISCUSSION

The purpose of this study was to analyze the potential etiological role of flaviviruses as WNV and others in aseptic meningitis and meningoencephalitis cases in Brazil. The association of WNV with neuroinvasive diseases has been widely investigated in several



countries (Kopel et al. 2011, Barzon et al. 2009, Feki et al. 2005, Gyure 2009, Morgan 2006), but in Brazil there is no systematic surveillance policy for these viral agents in such cases.

With the growing volume of international travel and commerce, pathogenic microorganisms can easily move between continents (Nash et al. 2001). The risk of unexpected cases of imported diseases justifies measures of clinical, laboratorial and environmental surveillance to avoid their dissemination. This study contributes on this regard.

The CSF specimens were received in Enterovirus Laboratory, convenient of south, southeast, Northeast and west-central Brazilian regions. They were tested for the presence of Enterovirus and presented negative results.

WNV is a worldwide emerging virus, being commonly involved in outbreaks and epidemics (Davis et al 2006, Gyure 2009, Julian et al. 2003, Nash et al. 2001, O'Leary et al. 2004, Feki et al. 2005).

WNV is spreading in South America and, in this context, it can be already circulating in Brazil, or it can be imported at anytime, leading to important implications for public health (Morales et al. 2006, Adrián Diaz et al. 2008, Mattar et al. 2005, Bosch et al. 2007).

A recent study reported serological evidence of WNV in Brazilian territory (Pauvolid-Corrêa et al. 2011) but its circulation in humans is still unclear. Thus, a continuous and effective countrywide WNV surveillance in these cases is indispensable. United States, Italy, Israel, England and Wales are examples of countries with implemented WNV surveillance programmes in humans, dead birds, mosquitoes and horses (CDC 2010, Kopel et al. 2011, Morgan 2006, Barzon et al. 2009).

The primers pairs designed for the two molecular approaches described in this report successfully amplified the partial genome of flavivirus samples used as positive controls, showing to be useful tools to detect *Flavivirus* in a few hours. This is particularly relevant considering the imminent entry of WNV in Brazil.

PCR-based assays has been widely used to detect WNV nucleic acid from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples (Burke & Monath 2001, Morais Bronzoni et al. 2005, Re et al. 2008, Feki et al. 2005, Lanciotti et al. 2000).

Application of Semi-Nested and Conventional PCR to detect flaviviruses in CSF did not reveal any evidence of flavivirus nucleic acids in these samples. Thirteen samples were considered indeterminate for having bands nearby the expected size. However, it was not confirmed by sequencing. Indeterminate results may have occurred by the degeneration of the primers, which allows its binding in some locations in the human genome similar to those in flavivirus genome. Further investigation is required in order to clarify the etiology of these cases.

These findings suggest the absence of flaviviruses such as WNV, JEV or SLEV in the CSF analyzed. With regards to WNV, Brazil seems to remain free of it. Nevertheless, current absence of WNV causing meningitis and meningoencephalitis cases does not exclude the hypothesis of its silent circulation or its maintenance only in birds and horses in Brazil.

In fact, this virus may already be in the country, but the lack of a WNV surveillance program on a national scale and clinical characteristics of WNV impedes definitive conclusions on this issue. The similarity of the symptoms among WNV infections and dengue fever may cause mistakes in clinical diagnosis and certainly leads to underestimation of these cases number. Moreover, 80 % of WNV-infected individuals are asymptomatic, approximately 20% develop the West Nile fever, a mild febrile flu-like illness and less than 1% develops West Nile neuroinvasive diseases (Davis et al. 2006, Mackenzie et al. 2004). In tropical regions, particularly, severe neurological diseases are rare in WNV infections. Some reasons for this low morbidity are reduction in virus loads by a mechanism involving antibody cross-reactivity in individuals previously infected with DENV or YFV, for example, and other factors associated with hosts or the environment (Chávez & Figueiredo 2006, Gyure 2009).

In Italy, surveillance of suspected cases of WNV infection and retrospective investigation of cases of meningoencephalitis of unknown etiology led to the identification of six patients with WNV neuroinvasive disease (Barzon et al 2009). Thus, WNV and also other flaviviruses, as JEV and SLEV, should be seriously considered in the differential diagnosis of aseptic meningitis and meningoencephalitis in Brazil.

In spite of the inherent sensitivity, specificity and robustness, PCR might have been insensitive to detect flaviviral RNA in CSF. In patients with West Nile neuroinvasive disease, this method was 100% specific but relatively insensitive compared with detection of WNV IgM in CSF (Lanciotti et al. 2000). On the other hand, serologic diagnostic methods have the disadvantages of nonspecificity, due to cross-reactivity among related flaviviruses, and the long time required by the PRNT assay, which could confirm the diagnosis (Lanciotti et al. 2000, Spinsanti et al. 2008).

Negative results for WNV found in this study agree with other previous results in Brazil (Chávez & Figueiredo 2006; Soares et al. 2010) and points to the need for additional studies on WNV. Even without a positive result, analyzing 123 CSF in England and Wales, Morgan (2006) highlighted the relevance of a structured WNV surveillance system.

This was a preliminary study. It is intended to continue monitoring and improving techniques for identifying WNV and other flaviviruses in aseptic meningitis cases in Brazil.

**ANEXO D – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO NO PERIÓDICO *VIRUS REVIEW AND RESEARCH***

Direct Detection of Enterovirus Genome in Cell-Culture Negative Cerebrospinal Fluid from Aseptic Meningitis Cases in Brazil.

Authors: Gina Peres Lima dos Santos, Fernanda Marcicano Burlandy, Eliane Veiga da Costa and Edson Elias da Silva.

Enterovirus Laboratory – Oswaldo Cruz Institute / Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil  
Av. Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Correspondent Author: Edson Elias da Silva, Enterovirus Laboratory - Oswaldo Cruz Institute / FIOCRUZ

E-mail: edson@ioc.fiocruz.br

Tel.: +55 21 2562 1804; Fax: +55 21 2562 1828

Keywords: Enterovirus, RT-PCR, Aseptic Meningitis, CSF.

**ABSTRACT**

Enteroviruses are the main etiologic agents involved in outbreaks and sporadic cases of aseptic meningitis. Viral isolation in permissive cells is a traditional method for diagnosis, but it is time consuming and may be unsuccessful due to low viral titers and because some enteroviruses do not replicate in routine cell cultures. Therefore, molecular techniques are increasingly being used for detection of these agents. In the present work, 267 cerebrospinal fluid (CSF) samples from aseptic meningitis and meningoencephalitis cases, received between 2008 and 2009, were tested by RT-PCR. These clinical samples presented negative results for virus isolation in cell culture. Enterovirus genome was detected in 59 CSF samples (22.1%). These results were confirmed by partial nucleotide sequencing. Some aspects of the patients included in this study were analyzed. Their ages ranged from four days to 72 years. Approximately 48% of patients were under 12 years old and there was no predominance regarding gender. Direct detection of the enterovirus genome from CSF shows to be appropriate in order to increase the chance of enterovirus detection in CSF samples from aseptic meningitis and meningoencephalitis cases. A new workflow is discussed.

## INTRODUCTION

Meningitis and meningoencephalitis are acute infections involving the central nervous system whose the main etiology is viral, and enteroviruses are responsible for more than 80% of the cases (Pallansch & Roos 2001). Different serotypes of enteroviruses, such as echovirus 4 (E4), E6, E13, E30 and coxsackievirus B5, are involved in outbreaks and sporadic cases of aseptic meningitis around the world (Choi et al. 2010; Dos Santos et al. 2006; Grenón et al. 2008; Hayashi et al. 2009; Juliá et al. 2009; Kmetzsch et al. 2006; Mirand et al. 2008; Papa et al. 2009; Tavakoli et al. 2008; Thoelen et al. 2003).

Enteroviruses belong to *Picornaviridae* family, are spherical and non-enveloped viruses, with a genome consisting of a positive-sense single-stranded RNA. The 5' terminal untranslated region (5' UTR) is highly conserved and is useful for molecular identification purposes of the *enterovirus* genus (Pallansch & Roos 2001; Racaniello 2001).

The diagnosis of aseptic meningitis can be carried out by several laboratorial techniques associated with clinical findings. Viral isolation in cell culture is a traditional method and it is still considered the gold standard method of diagnosis of enterovirus (WHO 2004). This methodology, however, may require up to 10 days for a positive result (Lee & Davies 2007; Pallansch & Roos 2001). In addition, virus isolation may be unsuccessful due to low viral titers in some clinical samples and also owing to the fact that some viral agents, such as Coxsackievirus A, does not replicate in routine cell cultures (Ishiko et al. 2002; Jaques et al. 2003; Santos et al. 2002).

Currently, molecular techniques have been increasingly used for detection of these agents in Cerebrospinal Fluid (CSF), such as RT-PCR, nested PCR, real-time PCR, multiplex PCR and nucleotide sequencing (Archimbaud et al. 2004; Brown et al. 2003; Heim & Schumann 2002; Jacques et al. 2003; Lee et al. 2002; Leitch et al. 2009; Nix et al. 2006; Oberste et al. 1999, 2006; Verstrepen et al. 2002). These methods are more sensitive, compared to cell culture, allowing the detection of a small number of copies of the viral genome present in clinical specimens, besides to presents high specificity and speed (Benschop et al. 2010; Jaques et al. 2003; Oberste et al. 1999; Ooi et al. 2010).

This study aimed the detection of the enteroviral genome in CSF specimens which presented negative results regarding virus isolation in cell culture.

## MATERIAL AND METHODS

### Clinical Specimens

We analyzed 267 CSF samples from patients of several locations in Brazil with clinical diagnosis of meningitis or meningoencephalitis of viral etiology, during 2008 and 2009. All samples were previously tested in the laboratory for the presence of enterovirus in RD and HEp-2 cell cultures, presenting negative results.

All experiments were performed in compliance with the relevant laws and institutional guidelines and in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki. The institutional committee CEP-IPEC/ FIOCRUZ approved the experiments.

### Extraction of Viral RNA and cDNA Synthesis

Enteroviruses potentially present in the CSF samples had their RNA extracted using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, NRW, Germany), according to the protocol provided by the manufacturer. The cDNA was synthesized using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), from 10 µl of RNA extracted.

### Molecular Detection of Enterovirus

A pair of primers (EVF = 5'-CTC CGG CCC CTG AAT GCG GCT A-3' and EVR= 5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC C-3'), which flank a fragment of 153bp of the 5' UTR, a conserved and common to the genomes of all known human enteroviruses was used for genomic amplification. This pair of primers is used routinely in the Enterovirus Laboratory for the molecular diagnosis of enterovirus (Dos Santos et al. 2006).

Four microliters of cDNA were added to the PCR mix, composed of 50 µM EVR, 50 µM EVF, 12.5 µl of GoTaq Green Master Mix (Promega, Fitchburg, WI, USA) and PCR water to a final volume of 25 µl. PCR was performed with a prior denaturation step of 3' / 95° C and 35 cycles of 45" / 95° C, 45" / 55° C and 45" / 70° C with a final extension of 7' / 70° C in a thermocycler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The visualization of the PCR amplified products, after staining with ethidium bromide 0.1 µg/ml, was done by electrophoresis on 10% acrylamide gels, using the 50bp marker (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The amplified products were visualized and scanned with the Universal Hood II Photo-Documentation System with UV light (BioRad, Hercules, CA, USA).

### Confirmation of Enterovirus Detection by Nucleotide Sequencing

Cycle-sequencing reactions were performed using 100 ng/µl of gel-extracted positive PCR products obtained with primers EVF/EVR, using the ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The nucleotide sequence analysis to confirm the virus identity was carried out by comparison with the GenBank database using BLASTn program (Altschul et al. 1990).

### Analysis of Patients Profiles

Some aspects of the patients included in this study, as state of origin, age and gender, were analyzed. The following age groups were defined: <1 year, 1-6 years, 7-12 years, 13-17 years, 18-30 years, 31-45 years and > 46 years.

## RESULTS

### Molecular Detection of Enterovirus

RT-PCR technique carried out from CSF extracted RNA was able to detect enteroviruses in 59 samples of the 267 CSF analyzed (22.1%). All enterovirus positive samples had their results confirmed by nucleotide sequencing. When compared with other sequences available at GenBank, all sequences were identified as partial 5' UTR of enterovirus.

### Analysis of Patient Profiles

Among the 267 patients included in this study, 121 (45.3%) were female and 146 (54.7%) were male. The distribution of cases by state of origin, by age and gender is shown in **Table 01**.

In the analysis of age groups, almost 10% of patients still had not completed one year of age and 24.3% had between two and six years. In addition, 21 patients (7.9%) were older than 46 years. The age of patients was, on average, 36 years, ranging from four days old to 72 years. The age of 52 patients (19.4%) was not informed.

Regarding the distribution by state of origin, 35.2% of patients were from Bahia State, 21%, from Rio de Janeiro and 11.6%, from Paraná.

## DISCUSSION

The objective of this study was to improve the laboratorial performance of the enterovirus-related meningitis and meningoencephalitis diagnosis by searching the presence of enterovirus RNA directly from patient CSF specimens. The dynamics of the currently methodology of diagnosis involves virus isolation attempts in cell cultures from clinical specimens such as feces, CSF and rectal swab. The cell lines currently used are permissive for most recognized enteroviruses (WHO 2004). Nowadays, regardless of the type of clinical sample, the molecular identification of enterovirus is performed only when a typical cytopathic effect in cell culture is present.

In a study conducted among 1998 and 2003 in Brazil, the isolation rate of enteroviruses from cases of aseptic meningitis was 15.8% (Dos Santos et al. 2006). Even using molecular diagnostic methods, the percentage of cases with unknown etiology is still considerable. This high rate of unexplained cases may be due to some factors such as problems in storage, transport of CSF and low sensitivity of cell cultures used, which may not be suitable for the isolation of some viral agents (King et al. 2007).

In the present study, we analyzed 267 CSF samples received between 2008 and 2009, which presented cell culture negative results for enterovirus. After RNA extraction from CSF and cDNA synthesis, enterovirus group-specific PCR was performed. The positivity rate found (22.1%) shows that the direct RNA detection from CSF is appropriate for an increased possibility of enterovirus detection in this type of clinical specimen.

PCR carried out in this study amplifies 153 bp of the 5' UTR of enterovirus genome using regular primers. This type of primer has a smaller chance to hybridize to nonspecific sites at viral genome. The choice of a conserved genome region coupled with the use of this type of initiator and the RNA extraction method contributed for the good performance of the detection.

Some aspects of epidemiological relevance of the patients were analyzed. Their ages ranged from four days to 72 years. Approximately 48% of patients were under 12 years old and there was no predominance regarding gender. These results confirm the epidemiological characteristics of aseptic meningitis patients reported in another study in Brazil (Dos Santos et al. 2006).

Considering that all samples used in this study were negative for virus isolation, it was possible to compare the performance of the direct extraction of CSF and virus isolation in cell culture for recovery of viral nucleic acid and its subsequent molecular detection.

The use of cell culture systems for isolation is a useful and reliable tool for enterovirus isolation and for increase of viral titer. Besides, the isolated virus can be preserved for future studies. However, in the current context which demands higher sensitivity and speed of diagnostic tests, the RT-PCR can be extremely useful to detect enterovirus in CSF without the need of cell culture.

Many studies report that the detection of enterovirus by PCR is more sensitive than cell culture-based tests, besides being faster and able to detect viruses which do not replicate in cultures (Benschop et al. 2010; Iturriza-Gómara et al. 2006; Nigrovic & Chiang 2000; Shoja et al. 2007; Van Doornum et al. 2007; Verstrepen et al. 2001). Buxbaum and colleagues (2001) also found greater positivity rates of enterovirus in CSF using the RNA extraction followed by RT-PCR compared to virus isolation in cell culture. This author suggests the use of both methods for the detection of enteroviruses.

In a study conducted by Santos and colleagues (2002), 15% of stool samples previously negative for virus isolation in cell culture were positive for enterovirus by RT-PCR, while Shoja and colleagues (2007), found a rate of 10%. Perhaps this lower proportion of positivity compared to the found in the present study (22.1%) is due to the easiness of virus isolation from stool samples in relation to the CSF. Due to the nature of the clinical

specimens, the use of viral RNA extraction directly from CSF may be more efficient than in fecal samples.

Direct detection of enterovirus RNA in CSF samples can improve the laboratorial diagnosis of enterovirus and be supportive for the aseptic meningitis and meningoencephalitis surveillance in Brazil. This methodology could be applicable specifically to CSF samples, in which low viral titers are expected, and also in outbreaks, where rapid results are required so that public health actions and epidemiological surveillance can be taken, in order to prevent the virus spread and disease transmission in the population. In an alternative to the traditional workflow, CSF samples would be subjected to direct extraction of RNA followed by RT-PCR alongside with a passage in cell culture attempting virus isolation. Thus, samples with high viral titer would have the positive result defined in a shorter time, not requiring a second passage. Negative samples in the first passage and RT-PCR would follow the current algorithm used by the Enterovirus Laboratory for viral isolation and subjected to a second passage, in order to minimize the possibility of false-negative results.

In addition to the above epidemiological implications, the rapid diagnosis is crucial for the patient because it reduces the unnecessary use of antibiotics and hospitalization, and also for the health system, once it leads to a reduction in the cost of the patient to health services (Brasil 2009; Buxbaum et al. 2001; Nigrovic & Chiang 2000; Oberste et al. 1999; Shoja et al. 2007; Verstrepen et al. 2001).

The knowledge generated from this study provide technical-scientific basement to justify increased investments in diagnostic methods for aseptic meningitis in Brazil and to stimulate new advances in the diagnosis of enterovirus.