

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**Diagnóstico, epidemiologia e caracterização molecular
do Herpesvírus humano 2 (HHV-2) em mulheres
profissionais do sexo e gestantes**

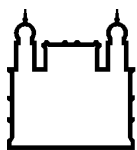
Lyana Rodrigues Pinto Lima

Orientadora: Dra Vanessa Salete de Paula

Instituto Oswaldo Cruz (IOC)

Rio de Janeiro

Julho/2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Medicina Tropical

Lyana Rodrigues Pinto Lima

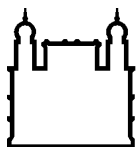
Diagnóstico, epidemiologia e caracterização molecular do Herpesvírus humano 2 (HHV-2) em mulheres profissionais do sexo e gestantes

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutora em Ciências pelo programa de Medicina Tropical.

Orientador(a): Dr^a Vanessa Salete de Paula

RIO DE JANEIRO

Julho/2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Lima, Lyana Rodrigues Pinto.

Diagnóstico, epidemiologia e caracterização molecular do Herpesvírus Humano 2 em mulheres profissionais do sexo e gestantes / Lyana Rodrigues Pinto Lima. - Rio de Janeiro, 2017.

126 f.

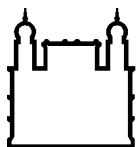
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Orientadora: Vanessa Salete de Paula.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Herpes. 2. HHV-2. 3. mulheres. 4. gestantes. 5. mulheres profissionais do sexo. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Medicina Tropical

Lyana Rodrigues Pinto Lima

Diagnóstico, epidemiologia e caracterização molecular do Herpesvirus Humano 2 em mulheres profissionais do sexo e gestantes

Orientadora: Dr^a Vanessa Salete de Paula

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dra. Elba Regina Sampaio Lemos - IOC/FIOCRUZ (Presidente)

Dr. Rafael Brandão Varella - UFF

Dra. Alcina Nicol - FIOCRUZ

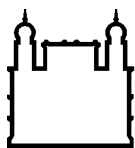
Dr. Marco Aurélio Horta – IOC/FIOCRUZ

Dra. Sylvia Teixeira- IOC/FIOCRUZ

SUPLENTE

Dra. Carmen Bauer- UFF

Dr. Mauro Romero Leal- UFF



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Diagnóstico, epidemiologia e caracterização molecular do Herpesvírus humano 2 em mulheres profissionais do sexo e gestantes

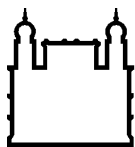
RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Lyana Rodrigues Pinto Lima

O Herpesvirus humano 2 é transmitido por via sexual e destaca-se como o principal causador do herpes genital no mundo, uma infecção altamente prevalente em mulheres. O herpes genital é caracterizado pelo desenvolvimento de vesículas bolhosas e dolorosas na região genital, porém a maioria dos indivíduos infectados não apresenta manifestações e não tem conhecimento sobre sua infecção. As mulheres desempenham um papel relevante na epidemiologia do HHV-2, pois além de serem capazes de transmitir o vírus sexualmente, elas podem transmitir o vírus de forma vertical para o feto, levando a um quadro de herpes neonatal. Diante disso e atrelado a falta de estudos que investiguem o HHV-2 no Brasil, esta tese teve como objetivo realizar o diagnóstico, estudar a epidemiologia e a diversidade molecular do HHV-2 em diferentes populações de mulheres profissionais do sexo e gestantes positivas e negativas para o HIV. Esta tese resultou em cinco artigos científicos, totalizando a análise de 646 amostras e envolvendo três populações distintas: mulheres profissionais do sexo, gestantes negativas para o HIV e gestantes positivas para o HIV. Para otimizar o diagnóstico, oligonucleotídeos sintéticos desenhados para quantificação absoluta do HHV-1 e HHV-2 por PCR em tempo real foram utilizados como curvas padrão para quantificação viral, e os resultados obtidos foram semelhantes ao padrão ouro utilizado no estudo (curva de DNA). Para avaliar o papel da mulher na transmissão sexual do HHV-2, 376 mulheres profissionais do sexo do Mato Grosso do Sul foram investigadas. Os resultados mostraram alta prevalência (47,3%) e presença de infecção primária com viremia detectada. As variáveis idade e número de parceiros sexuais se apresentaram como fatores de risco para a infecção causada pelo HHV-2. O uso de preservativo e o consumo diário de álcool diminuíram significativamente a chance de infecção. Para investigar o risco de transmissão vertical, 270 gestantes HIV negativas e positivas do Rio de Janeiro foram investigadas. Os resultados mostraram que a prevalência do HHV-2 em gestantes HIV-positivas

foi quase 3 vezes maior (59,7%) que nas HIV-negativas (20,6%). A viremia do HHV-2 foi detectada em ambos os grupos durante quadros de infecção primária. As gestantes HIV positivas também apresentaram o DNA viral detectado no sangue durante casos de recorrência e eliminação assintomática. As variáveis estudadas que foram estatisticamente ($p < 0,05$) associadas ao HHV-2 foram idade, relação CD4/CD8. O sequenciamento da glicoproteína B (gB) das primeiras cepas brasileiras revelaram que as mesmas pertencem ao clado B, porém duas cepas sequenciadas se destacaram por apresentar mais de 1% de divergência com as cepas previamente descritas, sugerindo a existência de um novo clado. Os resultados dessa tese construirão para facilitar o diagnóstico da infecção e a implantação de medidas de prevenção e controle do herpes genital em mulheres em idade sexualmente ativa.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Diagnosis, epidemiology and molecular characterization of human herpesvirus 2 in female sex workers and pregnant women

ABSTRACT

DOCTORATE TESIS

Human Herpesvirus 2 (HHV-2) is sexually transmitted and is the main cause of genital herpes in the world, and it is highly prevalent among women. Genital herpes is characterized by the development of bullous and painful vesicles in the genital region, but a majority of infected patients has no symptoms and is unaware of their infection. Women play a relevant role in HHV-2 epidemiology because they can pass the virus on to their sexual partners and to their babies through vertical transmission, causing neonatal herpes. In view of this and linked to the lack of studies that investigate HHV-2 in Brazil, this thesis aimed to perform the diagnosis, to study the epidemiology and molecular epidemiology of HHV-2 among female sex workers and pregnant women with and without HIV. This thesis results in five articles, involving three different populations and 646 samples were analyzed. To optimize the diagnosis, synthetic oligonucleotides designed for absolute quantification of HHV-1 and HHV-2 by real-time PCR were used as standard curves for viral quantification, and the study results were similar to the gold standard used in the study (DNA curve). To evaluate the role of women in the HHV-2 sexual transmission, 376 female sex workers from Mato Grosso do Sul were investigated. The results shown high prevalence (47.3%) and presence of primary infection with detectable levels of viremia. The variables age and number of sexual partners were the risk factors for the HHV-2 infection. Use of condoms and alcohol consuming decrease the chance of HHV-2 infection. To investigate the risk of vertical transmission, 270 HIV negative and positive pregnant from Rio de Janeiro were investigated. The results showed that the prevalence of HHV-2 among HIV-positive pregnant women was 3 times higher (59.7%) than among HIV-negative pregnant women (20.6%). HHV-2 viremia was detected in both groups during primary infection. HIV-positive pregnant had viral DNA detected in blood during recurrent herpes and asymptomatic shedding. The studied variables that were associated to HHV-2 with statistically significant ($p < 0.05$) were age, CD4/ CD8 ratio. Glycoprotein B (gB) sequencing of the first Brazilian strains revealed that they belonged to clade B, but two strains were highlighted because they showed more than 1% divergence when compared with previously described strains, suggesting a new clade. The results of this thesis will contribute to facilitate the diagnosis of the infection and the implantation of the measures of prevention and control for genital herpes among women of sexually active age.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquema da estrutura do Herpesvírus humano.....	2
Figura 1.2 Representação esquemática do genoma dos HHVs.....	3
Figura 1.3 Ciclo lítico da replicação do HHV em uma célula.....	5
Figura 1.4 Latência do HHV.....	8
Figura 1.5 Manifestações clínicas do herpesvírus 1 e 2.....	13
Figura 1.6 Estimativa do número de pessoas infectadas com o HHV-2 no mundo, divididas por sexo, idade e região.....	18
Figura 1.7 Distribuição geográfica dos clados genéticos do HHV-2.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDAS

A.C- Antes de Cristo

ACV- Aciclovir

ACVMP- Aciclovir monofosfatato

AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)

α -TIF- Fator indutor de transcrição de proteínas de fase α

ChHV- Herpevírus de chipamzé

DNA- Ácido desoxirribonucléico

ELISA- Ensaio imunoenzimático (*Enzyme linked immunosorbent assay*)

GAG- Glicosaminoglicano

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

HHV- Herpesvírus Humano

HHV-1-Herpesvírus Humano 1

HHV-2 - Herpesvírus Humano 2

HVEM- Mediador da entrada de herpesvírus

ICP- Proteína da célula infectada (*Infected cell protein*)

IE- Genes imediatamente iniciais (*immediately early genes*)

ICTV- Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

IgG- Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IST- Infecção sexualmente transmissível

Kb- Kilobase

L- Genes tardios (*later genes*)

LAT- Gene associado à latência

miRNA- micro RNA

MPS- mulheres profissionais do sexo

nM- nanomolar

nm- Nanômetro

OMS-Organização Mundial de Saúde
OCT-Proteínas reguladoras de transcrição
ORF- Região de leitura aberta (*open reading frame*)
Ori- Região de origem de replicação
pb – Pares de base
PBMC- Células Mononucleares de sangue periférico
PCR- Reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction*)
RNA- Ácido ribonucleíco
RNAm-RNA mensageiro
siRNA- pequenos RNAs de interferência
SEM- Herpes nas mãos olhos e pele (*skin, eyes, and mouth herpes*)
T CD 4+- Linfócito T auxiliar
TCD 8+- Linfócito T citotóxico
TK-Timidina Kinase
UL- Região única e longa (*Unique and Large*)
US- Região única e curta (*unique and short*)
VP- Proteína viral (*viral protein*)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer a Deus por toda força, perseverança e confiança que meu deus durante esses 4 anos, que não foram fáceis. Gostaria de agradecer em especial a minha família: Pai, mãe, irmãos e avós que sempre sonharam junto comigo e que me incentivaram todos esses anos de estudo. Amo vocês, minha base, meu alicerce e inspiração.

O agradecimento mais especial vai para o meu marido Raphael que me acompanha desde a graduação, que me apoiou sempre e que algumas vezes deixou de investir nele para investir em mim. Amor, eu sempre serei grata por tudo que você fez por mim durante todos esses anos. Obrigada pela paciência, carinho e cumplicidade. Amo você!!!

Gostaria de agradecer a minha orientadora Vanessa por todos os ensinamentos, conselhos e também amizade ao longo da minha pós-graduação. Não posso esquecer de agradecer de toda a equipe do LDTV que me acolheu durante a maior parte do Doutorado e também a equipe do LVM que me recebeu com tanto carinho nos últimos meses.

Um agradecimento especial vai para minha querida amiga Amanda Perse que me ajudou muito nesses 4 anos. Sempre muito prestativa e carinhosa, sua amizade foi essencial principalmente nos momentos que precisava compartilhar minhas angústias discentes.

À Nathália Alves e ao Guilherme Padalecki que foram meus ICs durante o Doutorado, que pegaram pesado comigo em todos os experimentos. Muito obrigada, sem vocês eu não daria conta de fazer esses trilhões de PCRs! Rs...

Quero agradecer também aos meus amigos da Medicina Tropical que fizeram meus anos de estudos mais leves e divertidos: Jorlan, Helena, Thais e Dadade.

Gostaria de agradecer aos colaboradores: Dra Ana Rita Motta Castro, Carlos Vellasco e José Henrique Pilotto, por nos ceder/permitir a coleta das amostras necessárias para a realização deste estudo. Gostaria de agradecer ao Dr. Christian Niel, pela paciência e ajuda na confecção do último artigo desta tese.

Quero agradecer a Pós-Graduação em Medicina Tropical, CAPES pela concessão da Bolsa e FAPERJ pelo auxílio financeiro para a execução do projeto.

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	1
1.1) Histórico	1
1.2) Classificação e morfologia dos alphaherpesvirus	1
1.3) Genoma viral.....	3
1.4) Replicação viral.....	4
1.5) Latência viral	7
1.6) Patogenia e manifestações clínicas	9
1.7) Diagnóstico	12
1.7.1) <i>Cultura de células</i>	13
1.7.2) <i>Detecção do anticorpos</i>	13
1.7.2.1) <i>Western Blotting</i>	14
1.7.2.2) <i>ELISA</i>	14
1.7.3) <i>Detecção do antígeno viral</i>	15
1.7.3.1) <i>Imunofluorêscencia</i>	15
1.7.3.2) <i>PCR e qPCR</i>	15
1.7.3.3) <i>Sequenciamento de ácido nucléico</i>	16
1.8) Epidemiologia.....	17
1.9) Epidemiologia molecular	20
1.10) Prevenção e Tratamento.....	22
1.11) Herpes genital em mulheres profissionais do sexo	25
1.12) Herpes genital em gestantes e herpes neonatal.....	26
2) JUSTIFICATIVA.....	29
3) OBJETIVOS.....	31
Objetivo geral	31
Objetivos específicos	31
4) RESULTADOS.....	32
Artigo 1	33
Artigo 2.....	37
Artigo 3.....	Erro! Indicador não definido.

Artigo 4	Erro! Indicador não definido.
Artigo 5	61
<u>5) DISCUSSÃO</u>	72
<u>6) CONCLUSÃO</u>	84
<u>7) REFERÊNCIAS</u>	855
<u>8) ANEXOS</u>	105

1) INTRODUÇÃO

1.1) Histórico

As lesões causadas pelos Herpesvírus humanos (HHV ou HSV) são conhecidas há muitos milênios e a história natural da infecção foi descrita há pelo menos dois séculos. Descrições de lesões genitais semelhantes às causadas pelo Herpesvírus humano 2 (HHV-2) foram descritas em sumérios no terceiro milênio antes de Cristo (a.C) e em papiros de Ebers (1500 a.C) (Roizman *et al.*, 2013). Hipócrates foi o primeiro a utilizar o termo *herpes* para descrever as lesões que se espalhavam pela pele, como vesículas e ulcerações. As lesões herpéticas também caracterizavam a doença *Herpes febrilis*, descrita por Heródoto (484/425 a.C) (McGeoch *et al.*, 2006).

O HHV foi isolado no século XIX por Lowenstein (Roizman *et al.*, 2013). No século XX foi demonstrado que os isolados virais infectavam uma grande quantidade de hospedeiros, como ratos, camundongos, coelhos, cobaias e macacos (Miranda *et al.*, 2002), e que este vírus poderia se multiplicar rapidamente em cultura de células fibroblásticas, epiteliais, nervosas e ovos embrionados, levando à lise celular. Em 1930, Andrews and Carmichael conseguiram demonstrar a conexão entre o HSV e as infecções recorrentes que ocorriam apenas em indivíduos com anticorpos neutralizantes. Quarenta anos após o isolamento, Schneeweis demonstrou que existiam 2 sorotipos de HSV (HSV-1 e HSV-2) que foram formalmente designados pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* com Alphaherpesvirus humano 1 e 2 (ICTV, 2016).

1.2) Classificação e morfologia dos alfa herpesvírus

O herpesvírus humano (HHV) é classificado dentro da família *Herpesviridae* e da subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Simplexvirus* (ICTV, 2016). O vírion é uma partícula esférica que mede aproximadamente 186 nm de diâmetro. O HHV é composto por material genético viral, capsídeo de simetria

icoasaédrica, uma camada rica em proteínas chamada de tegumento e um envelope lipídico rico em glicoproteínas virais (Kukhanova *et al.*, 2014) (Figura 1.1). O core viral é composto por um DNA linear de dupla fita (Roizman *et al.*, 2013). O tegumento é uma camada amorfa localizada entre o core e o envelope. Esta estrutura consiste em 26 proteínas, nas quais algumas participam: do transporte do capsídeo para o núcleo e outras organelas celulares (UL36, UL37, ICP0) (Radtke *et al.*, 2010); na entrada do DNA viral no núcleo (VP1-2, UL36) (Jovasevic *et al.*, 2008); na ativação de genes precoces (VP16) (Ace *et al.*, 1989); na supressão da biossíntese proteica celular e na degradação do RNA mensageiro (VHS, UL41) (Barzilai *et al.*, 2006).

O capsídeo é composto por 162 capsômeros. A parte mais externa do capsídeo é composta por quatro proteínas principais: a UL19 (VP5) que é maior proteína do capsídeo, a UL35 (VP26) que é uma proteína acessória, as proteínas UL18 (VP23) e a UL38 (VP19c) as quais as suas funções ainda não são conhecidas (Roizman *et al.*, 2013). O envelope viral é formado por uma camada lipídica com 11 glicoproteínas (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM) que estão principalmente envolvidas com a adsorção do vírus na célula (Chowdhury *et al.*, 2013). A camada lipídica do envelope é formada pela membrana celular durante a saída do vírus da célula por exocitose.

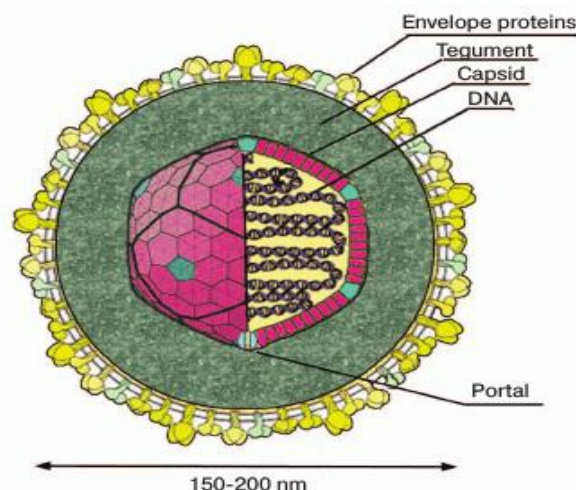


Figura 1.1 Esquema da estrutura do Herpesvírus humano (Adaptado de Kukhanova *et al.*, 2014)

1.3) Genoma viral

O genoma do HHV-2 é constituído por uma molécula de DNA linear dupla fita que mede aproximadamente 154.700 bp com 70,4% de C+G (Dolan *et al.*, 1998). O genoma consiste em dois componentes covalentemente ligados, designado como longo (*long* - L) e curto (*short* - S), sendo que cada componente é constituído de regiões únicas flanqueadas por regiões repetidas e invertidas (Roizman *et al.*, 2013). As repetições do componente L são designadas como *ab* e *b'a'*, enquanto os componentes S são *a'c'* e *ca* (Figura 1.2). Pelo menos 74 proteínas diferentes são codificadas pelo genoma viral, (Dolan *et al.*, 1998), grande parte delas compõe o capsídeo, tegumento e envelope. Durante a infecção, ocorre a circularização do DNA viral no núcleo da célula hospedeira (Whitley e Roizman, 2001).

O genoma do HHV-2 contém três origens de replicação: OriS que está presente duas vezes no genoma viral na região repetida *c*, e a OriL que está presente em *aL*. A OriS contém um palíndromo imperfeito de 45 pb enquanto a OriL contém um palíndromo perfeito de 144 pb (Ward and Weller 2011). Devido à presença das regiões repetidas e invertidas, as unidades *L* e *S* do genoma podem ser invertidas uma em relação à outra, para se obterem quatro isômeros lineares (Roizman *et al.*, 2013). Já foi demonstrado que nem a presença de regiões internas repetidas e nem a orientação dos componentes do genoma afetam a viabilidade viral em células Vero (Jenkins e Roizman, 1986).

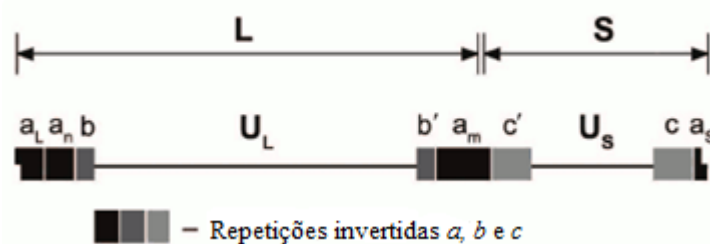


Figura 1.2. Representação esquemática do genoma dos HHVs. (adaptada de Mocarski e Roizman, 1982).

1.4) Replicação viral

O ciclo de vida do HHV pode ser dividido em 5 etapas: (1) entrada do vírus na célula hospedeira, (2) expressão dos genes virais, (3) replicação do genoma viral, (4) montagem da progênie e (5) saída da célula hospedeira. Em linhagens de células permissivas este ciclo dura de 18 a 20 horas (Kukhanova *et al.*, 2014). Para iniciar a replicação viral, o HHV-2 interage com receptores presentes na superfície da célula hospedeira, em um processo chamado de adsorção viral. Primeiramente, as glicoproteínas C e B (gC e gB) do envelope viral interagem com as cadeias de glicosaminoglicanas (GAGs) na superfície celular, principalmente com as moléculas de heparan sulfato (Spear *et al.*, 1992). Para que haja a penetração viral, a glicoproteína D (gD) interage com um dos receptores de reconhecimento de sinal, e assim, desencadeia a fusão, a partir do recrutamento de três glicoproteínas adicionais (gB, gH, gL). O heterodímero gB, gH e gL executa a fusão do envelope viral com a membrana plasmática ou vesícula endocítica da célula alvo (Nicola *et al.*, 2003). A gD pode se ligar a três tipos de receptor: nectina - 1, nectina 2, mediador de entrada para herpesvírus (HVEM) e 3-O heparan sulfato sulfatado (3-O-S-HS). O último é produzido pela enzima 3-O-sulfotransferase 2-7 (3-OST) (Arii *et al.*, 2009) (Figura 1.3).

A

entrada do vírus na célula culmina na liberação do capsídeo e de proteínas do tegumento no citoplasma. O capsídeo associado às proteínas do tegumento é transportado até o poro nuclear (Gowland *et al.*, 2004). Na superfície da membrana nuclear, a proteína de tegumento UL36 (VP1/2) e a nucleoporina Nup358 e Nup214 se ligam ao capsídeo, direta ou indiretamente, estabelecendo as interações necessárias para que haja o transporte do DNA viral para o núcleo mediado por β importina (Abaitua e O'hare, 2008; Copeland *et al.*, 2009). A transcrição e a replicação do genoma viral, bem como a montagem do capsídeo da progênie viral ocorrem dentro do núcleo. A infecção acarreta em reorganização do núcleo, causando aumento no seu tamanho, rompimento do nucléolo (Callé *et al.*, 2008), condensação da cromatina e a subsequente destruição desta e da lâmina nuclear em etapas tardias da infecção (Simpson-Holley *et al.*, 2005). Os principais processos celulares, transcrição e síntese

protéica são bloqueados com o intuito de aumentar a eficiência da transcrição e replicação virais (Jenkins e Spencer, 2001; Matis e Kúdelová, 2001).

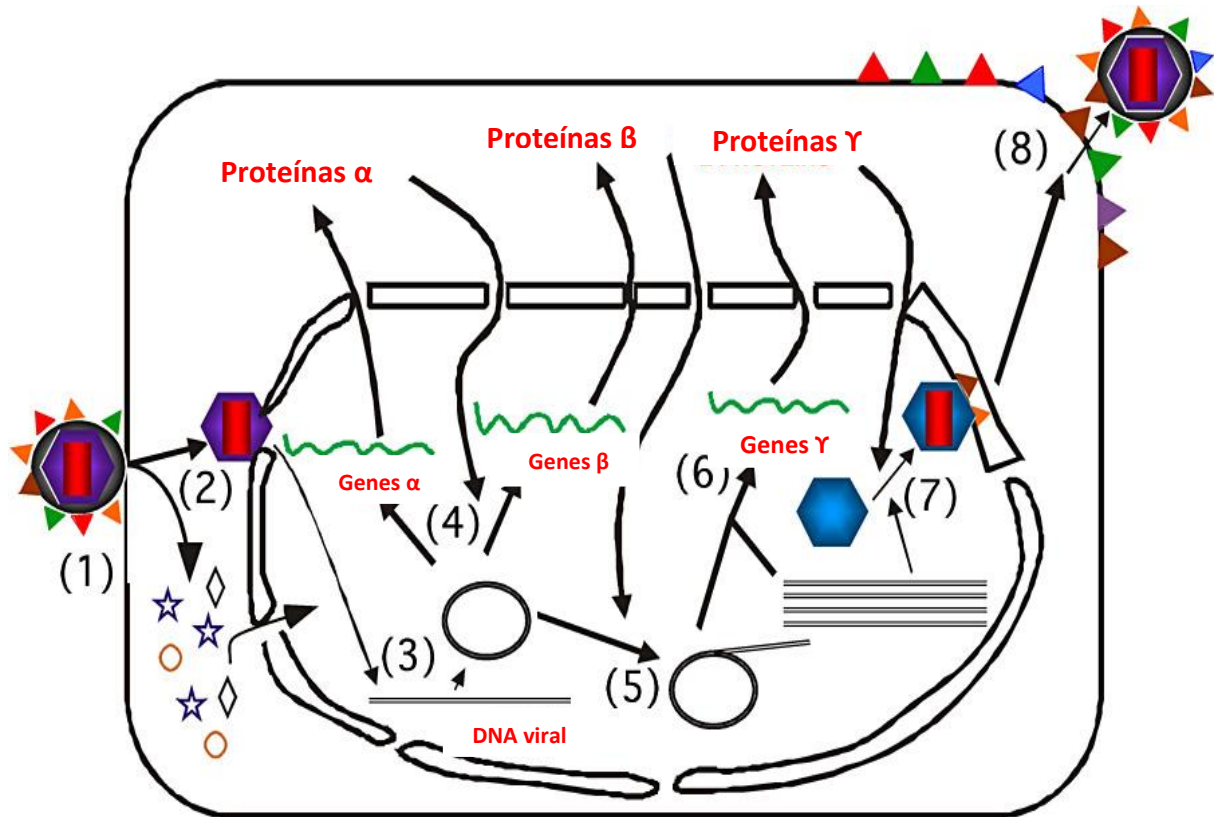


Figura 1.3. Ciclo lítico da replicação do HHV em uma célula. Os estágios de infecção: (1) Ligação ao receptor e fusão com a membrana; (2) Liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma celular e transporte do nucleocapsídeo ao poro nuclear; (3) Liberação do DNA viral dentro do núcleo; (4) Transcrição e tradução dos genes α e β ; (5) Síntese do DNA viral; (6) Transcrição e tradução dos genes γ ; (7) montagem do capsídeo e empacotamento do DNA (8) saída da prógenie viral (Adaptado de *Frontiers in Bioscience* 7, 2002)

O RNA mensageiro viral é sintetizado pela RNA-polimerase II celular com a participação de fatores virais em todas as etapas da infecção. A transcrição das proteínas virais ocorre como uma cascata regulada e sequencial. Primeiramente, são transcritos os genes imediatamente iniciais ou de fase α , após os iniciais ou de fase β e por último os tardios ou de fase γ (Hancock *et al.*, 2006). Para a transcrição dos genes imediatamente iniciais, a presença da

proteína do tegumento VP16 é importante. A VP16 se liga aos fatores de transcrição celular Oct-1 e HCFC1 formando, assim, o complexo de pré-iniciação viral. Nesta fase são produzidos seis transcritos: ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 e US1. 5. Esses genes estão relacionados com a reorganização dos processos celulares, beneficiando a replicação viral (Cástková e Benes, 2009).

A ICP0 atua como um transativador de diversos genes, estimulando a expressão de genes pertencentes a todas as três classes temporais (fases α , β e γ) durante a infecção lítica (Hancock *et al.*, 2006). A proteína ICP4 pode reprimir a expressão gênica dos genes α (Roberts *et al.*, 1988; Gu e Deluca, 1994; Carrozza e Deluca, 1996) e ativar a expressão dos genes β e γ a partir da interação com fatores de transcrição ligados a RNA polimerase II (Smith *et al.*, 1993; Gu e Deluca, 1994). A proteína ICP22 funciona como um repressor de promotores de vários genes virais ao se ligar com o fator de alongamento da transcrição b (P-TEFb) (Guo *et al.*, 2012). A proteína ICP27 contribui para diminuição da expressão de genes celulares através da inibição do processamento do RNAm (Sandri-Goldin e Mendoza, 1992; Lindberg e Kreivi, 2002). A proteína ICP47 impede o transporte de peptídeos antigênicos para o retículo endoplasmático, sendo crucial para a neurovirulência, uma vez que inibe a resposta da célula T do tipo CD8+ (Hill *et al.*, 1995).

A principal função das proteínas codificadas pelo gene α é a ativação da expressão dos genes β . As proteínas e enzimas codificadas pelos genes β estão envolvidas na replicação do genoma viral (por exemplo, DNA polimerase do HHV, UL30), regulação do metabolismo nucleotídico (por exemplo, timidina-quinase, UL23), supressão de genes imediatamente iniciais α e a ativação de genes tardios γ (Roizman *et al.*, 2013).

O primeiro passo da replicação do DNA do HHV é o desenrolamento da dupla hélice, realizado pelas proteínas ICP8 (UL29) e/ou UL9, nas regiões ricas em AT das origens de replicação OriL ou OriS. As fitas de DNA são sintetizadas pela DNA polimerase viral (UL30) complexada com fator de processamento UL42 (Zuccola *et al.*, 2000). Logo após o início da replicação do DNA viral, os níveis de expressão de genes tardios aumentam, especialmente daqueles que

codificam as proteínas do capsídeo, permitindo então a montagem da progênie viral (Kukhanova *et al.*, 2014). Com a montagem do capsídeo e o empacotamento do genoma viral, o nucleocapsídeo sai do núcleo através do poro nuclear ou por formação de vesículas com a membrana nuclear. O capsídeo é transportado do núcleo para o citoplasma com a participação das proteínas UL36 e UL37 (Sandbaumhüter *et al.*, 2013), chegando no citoplasma, as partículas virais passam por um processo de maturação. Após isto, o vírus é liberado por exocitose levando também a formação do envelope viral.

1.5) Latência viral

Após a replicação primária no sítio de infecção, o HHV entra nos neurônios sensoriais através da fusão com o terminal axonal. Assim, o nucleocapsídeo é carregado por transporte retrógrado para o corpo celular dos neurônios (Roizman *et al.*, 2013). No núcleo da célula neuronal, o DNA viral é circularizado para formar um DNA episomal empacotado em histonas (Deshmane e Fraser, 1989) (Figura 1.4).

A latência dos HHV ocorre tipicamente nos gânglios trigêmeos e dorsais. Durante a infecção latente, a transcrição dos genes α , β , e γ é suprimida e apenas são detectados os transcritos associados à latência (LAT's). Embora praticamente todos os neurônios ganglionares infectados tenham silenciado a expressão dos genes do ciclo líticos durante a latência, alguns estudos têm demonstrado que a baixa expressão dos genes líticos e a reativação podem ocorrer em alguns neurônios e desta forma, por exemplo, que ocorre a frequente eliminação genital do HHV-2 em alguns indivíduos (Tronstein *et al.*, 2011; Phipps *et al.*, 2016; Schiffer *et al.*, 2016).

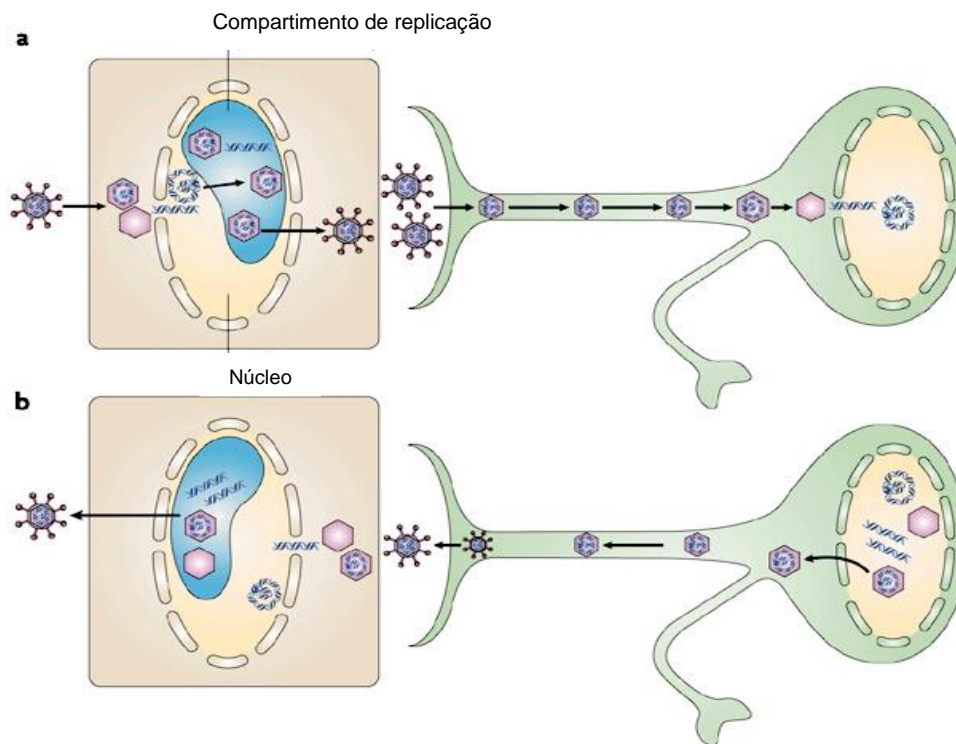


Figura 1.4 - a: Latência do HHV. Ciclo lítico do HHV nas células epiteliais, seguido pelo transporte anterógrado para estabelecimento de latência nos nervos sensoriais. **b:** Reativação da infecção com o transporte retrógrado do vírus e expressão dos genes virais do ciclo lítico. Adaptada de David M. Knipe & Anna Cliffe, 2008 (Knipe e Cliffe, 2008).

Os LATs desempenham vários papéis na latência e esta região é também a fonte de miRNAs (micro RNAs) que podem também modular a infecção (Niu *et al.*, 1998; Bianco *et al.*, 2004). Os LATs e miRNAs realizam a vigilância e a degradação de transcritos, em baixos níveis, dos genes virais silenciados. O fracasso das operações de vigilância e a rápida degradação resultariam em uma reativação espontânea e destruição de neurônios (Roizman *et al.*, 2011). A reativação da latência ocorre quando os níveis transcricionais dos genes LAT diminuem e os principais genes de fase lítica aumentam (Du *et al.*, 2011; Mukomolov *et al.*, 2012). Na fase latente, os genes LAT são produzidos

em abundância, porém a infecção lítica do HHV pode ser reativada em qualquer momento dependendo de diversos fatores do hospedeiro, como estresse e imunossupressão (Stapleton e Lemon, 1987). O HHV, então, retorna pelos axônios, produzindo um novo ciclo de infecção produtiva no sítio da infecção inicial ou próximo deste sítio, podendo resultar no reaparecimento da doença (Quinn *et al.*, 2000; Kimberlin, 2003; Kimberlin e Whitley, 2005) (Figura 1.4). Muitas vezes esta reativação inicial não é visível ocorrendo a mesma de forma assintomática ou conduzindo lesões aparentes no hospedeiro (Mitsui *et al.*, 2006; Bloom *et al.*, 2010; Donnan *et al.*, 2012).

1.6) Patogenia e manifestações clínicas

A infecção pelo HHV requer contato íntimo (por exemplo: relação sexual, troca de saliva e outros) do indivíduo susceptível com o indivíduo infectado que esteja excretando o HHV. O contato direto do tecido infectado com a mucosa ou pele lesionada (por exemplo: com abrasões ou microlesões) fornece uma porta de entrada para o HHV no hospedeiro. Embora as lesões herpéticas na região orofacial sejam comumente atribuídas ao HHV-1 e as lesões na região genital sejam associadas ao HHV-2, as infecções em ambos os sítios podem ocorrer com os dois vírus (Roizman *et al.*, 2013). Apesar do HHV-1 causar a herpes genital, ele dificilmente produz uma infecção recorrente neste sítio, o mesmo acontece com o HHV-2 quando infecta a orofaringe (Bernstein *et al.*, 2013). Este fato pode ser explicado pelo tropismo natural do sítio de infecção e como consequência de reativação dos diferentes vírus (Engelberg *et al.*, 2003).

Os indivíduos que não apresentam anticorpos pré-existentes para os HHV desenvolvem uma infecção primária ou primoinfecção após a primeira exposição ao vírus, seja ele o HHV-1 ou HHV-2. A recorrência do HHV é definida como "infecção recorrente" e se caracteriza pelo reaparecimento dos sintomas em um indivíduo soropositivo (Roizman *et al.*, 2013). De forma geral, na infecção primária ocorre uma replicação nas mucosas, resultando em uma infecção nos gânglios sensoriais onde o vírus é transportado para a raiz do gânglio dorsal (Roizman *et al.*, 2013). Estudos reportam que durante a infecção genital primária

ou herpes labial recorrente, (Johnston *et al.*, 2008; Juhl *et al.*, 2010) o HHV pode ser detectado no sangue periférico, o que não é tão comum, já que o vírus geralmente segue a rota neuronal para se disseminar. A viremia dos HHV também tem sido associada com casos graves da doença, como infecção disseminada em neonatos (Berrington *et al.*, 2009; Corey e Wald, 2009) em adultos e pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes (Berrington *et al.*, 2009; Corey e Wald, 2009), além de casos de hepatite (Nienaber *et al.*, 2012; Alidjinou *et al.*, 2015).

As patologias mais comumente produzidas pelo HHV incluem gengivoestomatite, herpes labial e herpes genital, que são geralmente caracterizadas por úlceras vesiculares, embora estas possam ser menos visíveis na área genital. As lesões herpéticas apresentam quantidades elevadas de partículas virais e infiltrados leucocitários que controlam a infecção. Após 21 dias do aparecimento das lesões, há o estabelecimento de crostas que são resolvidas sem a formação de cicatrizes (Roizman *et al.*, 2013).

A infecção primária pelo HHV-1 ocorre geralmente na infância e manifestações clínicas relacionadas variam desde infecções assintomáticas, cerca de 95% dos casos (Lupi *et al.*, 2000) resultam em febre, dor de garganta, lesões vesiculares e ulcerativas, gengivoestomatite, edema, linfadenopatia localizada, anorexia e mal estar. O período de incubação varia de dois a 12 (média de quatro) (Roizman *et al.*, 2013). A infecção primária pelo HHV-2 na região genital geralmente é mais grave, e caracterizada pelo aparecimento de máculas e pápulas, seguido por vesículas, pústulas e úlceras. Existe uma grande quantidade de partículas virais replicando no trato genital (mais de 10^6 partículas virais por 0,2 uL de inóculo) e o período de excreção viral persiste em média por três semanas. Dentre as manifestações clínicas associadas com a infecção primária podemos destacar: febre, disúria, adenopatia inguinal localizada e mal estar. A gravidade da infecção genital primária e suas complicações são estatisticamente maiores em mulheres do que em homens, por motivos ainda desconhecidos (Roizman *et al.*, 2013)

A infecção pelo HHV também pode resultar em várias outras doenças de pele, como eczema herpético em indivíduos com dermatite atópica, o que pode

ser fatal em crianças (Leung, 2013), parâncio herpético, no qual as lesões se manifestam nas pontas dos dedos (Hoff e Gerber, 2012) e herpes gladiatorum (Mirfazaelian e Daneshbod, 2013), uma condição herpética facilitada pela pele lesionada e frequentemente observada em indivíduos que praticam esportes como a luta livre. Além das doenças dermatológicas, os HHV-1/2 também estão associados com complicações oculares, principalmente ceratite epitelial ou estromal (infecção da córnea com o HHV). Outras manifestações típicas do HHV na área ocular incluem infecções na pálpebra e na conjuntivite (Suazo *et al.*, 2015) (Figura 1.5).

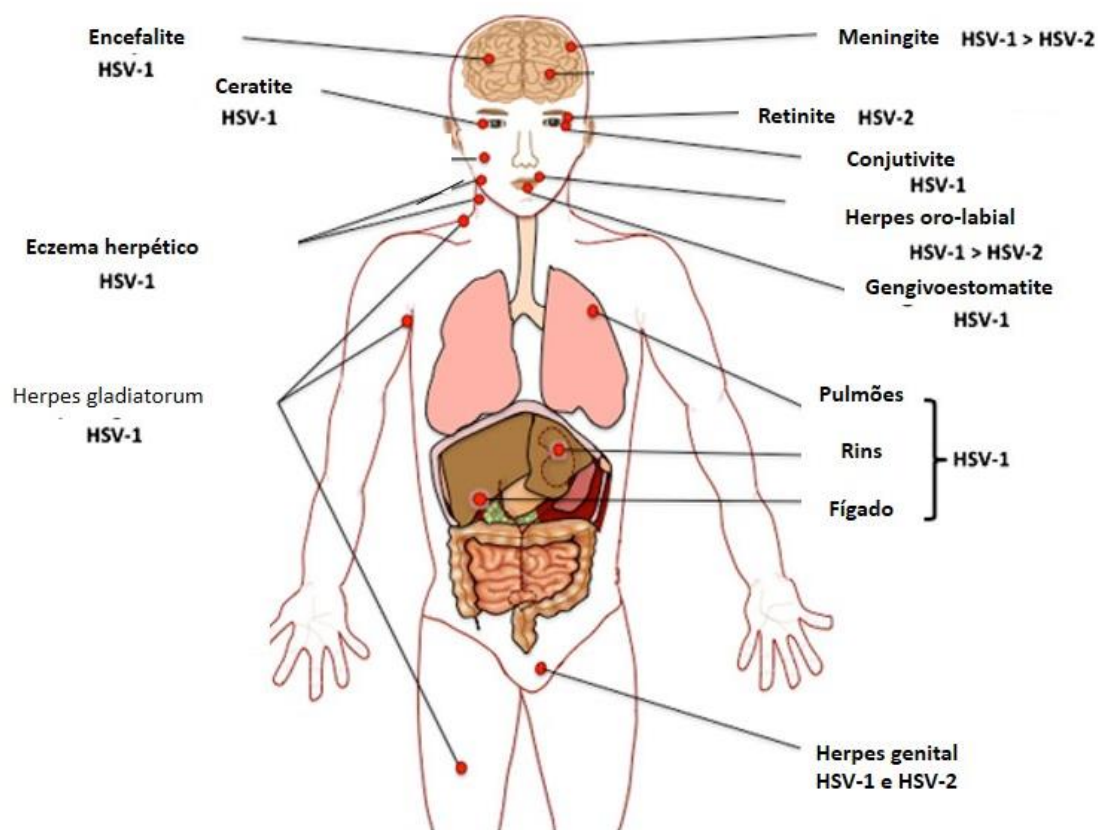


Figura 1.5- Manifestações clínicas dos Herpesvírus humano 1 e 2. Adaptada de Suazo et al. 2015

O HHV tem a capacidade de infectar o sistema nervoso central, levando ao desenvolvimento de encefalite e meningite que afetam principalmente os

neonatos. Este tipo de infecção também pode ocorrer em adultos, sendo o HHV a principal causa de meningite e encefalite viral em todo o mundo (Riancho *et al.*, 2013). Embora o HHV-2 seja capaz de infectar o sistema nervoso (0,016% dos casos), o principal agente causador de encefalite e meningite em crianças e adultos é o HHV-1 (Jaques *et al.*, 2016).

A infecção em neonatos por HHV é incomum e é caracterizada como uma doença grave com alta mortalidade e o desenvolvimento de incapacidades principalmente neurológicas (Corey e Wald, 2009; Cherpes *et al.*, 2012). Embora o tratamento específico reduza significativamente a mortalidade infantil, o desenvolvimento de sequelas neurológicas tem aumentado nos últimos anos (Cherpes *et al.*, 2012). Aproximadamente 75% das infecções por HHV em neonatos é causada pelo HHV-2, sendo o HHV-1 responsável pelo restante (Kimberlin *et al.*, 2001). A transmissão do HHV da mãe para o bebê está associada à infecção genital primária no último trimestre e a eliminação assintomática do vírus na mucosa genital próximo ao parto (James e Kimberlin, 2015).

Embora as infecções causadas pelo HHV estejam geralmente associadas a patologias de pele, mucosa e sistema nervoso central, estes vírus também podem infectar outros tecidos produzindo lesões graves. Os HHVs podem infectar uma gama de órgãos no corpo, embora a frequência destas infecções seja relativamente baixa. O HHV infecta o fígado (Alidjinou *et al.*, 2015; Gutierrez *et al.*, 2016) e os rins (Capretti *et al.*, 2013) produz sepse (Haag *et al.*, 2015) e lesões agudas no pulmão (Astuto *et al.*, 2014; Berardi *et al.*, 2015). Essas condições raramente ocorrem em indivíduos imunocompetentes e usualmente são predominantes em imunocomprometidos, pacientes transplantados e em neonatos (Suazo *et al.*, 2015).

1.7) Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial das infecções causadas pelos herpesvirus 1 e 2 vêm sofrendo drásticas modificações com o advento das técnicas moleculares. Porém, o diagnóstico clínico dos herpesvírus ainda é realizado pela identificação

das lesões vesiculares agrupadas, eritematosas, que apresentam pápulas crostosas durante 1 a 3 dias (Roizman *et al.*, 2013).

1.7.1) Cultura de células

A técnica clássica de diagnóstico laboratorial para o HHV1/2 é o isolamento viral. Várias linhagens de células primárias, diplóides e contínuas podem ser usadas para o isolamento dos HHV a partir de amostras clínicas. As células mais comumente utilizadas são células MRC-5 (fibroblastos humanos), células Vero (rim de macaco), células HEp-2 (carcinoma espinocelular laríngeo), células de rim de hamster neonatos e células de rim de coelho (Ustaçelebi, 2001). O efeito citopático (CPE) causado pela inoculação do HHV na cultura se desenvolve geralmente após 24-72 horas, mas pode variar para até 4-6 dias se a concentração de vírus na amostra for baixa. As culturas devem ser realizadas por aproximadamente 7 a 10 dias (Legoff *et al.*, 2014), e este longo tempo para a detecção do vírus se destaca como o maior problema desta técnica (Kimberlin, D., 2004)

A tipagem de HHV pode ser realizada diretamente nas culturas de células infectadas utilizando imunofluorescência direta que constitui o procedimento mais praticado ou por ensaios moleculares (Ustaçelebi, 2001). O diagnóstico da infecção do HHV em cultura de tecidos tem baixa sensibilidade, porque o HHV é isolado de lesões em cerca de 80% das infecções primárias, mas em apenas 25-50% das lesões recorrentes. A incapacidade de detectar o HHV por cultura não indica ausência de infecção pelo HHV (Wald *et al.*, 2003).

1.7.2) Detecção do anticorpos

A detecção de anticorpos IgG específicos dos HHV pode ser realizada por vários métodos imunológicos. Os ensaios sorológicos tipo-específicos para os HHV baseiam-se na detecção de anticorpos específicos contra a glicoproteína gG1 (HHV-1) e gG2 (HHV-2) utilizando antígenos nativos, purificados ou recombinante (Wald e Ashley-Morrow, 2002).

1.7.2.1) *Western Blotting (WB)*

O teste não comercial mais indicado para detecção do HHV-2 é o teste Western blotting. Esse teste é utilizado em laboratórios especializados de referência, mas não são replicáveis em muitos contextos limitando, assim, sua adequação para estudos epidemiológicos em larga escala (Legoff *et al.*, 2014). O teste Western Blotting para a detecção de IgG é considerado excelente para o diagnóstico do HHV e pode discriminar as infecções entre o HHV-1 e o HHV-2, mas este método é demorado e caro, podendo ser de difícil interpretação (Corey *et al.*, 2004).

1.7.2.2) *Ensaio enzimático (ELISA)*

Outro teste que utiliza a gG para discriminar entre as infecções causadas por HHV-1 e o HHV-2 incluem testes de ELISA. No entanto, estes ensaios são menos sensíveis que o Western Blotting. As sensibilidades destes testes tipo-específicos variam de 84-99% e os resultados falso-negativos podem ser mais frequentes nos estágios iniciais da infecção. As especificidades geralmente não são muito altas porém são $\geq 80\%$ (Hook, 2016). Os testes de ELISA comercial tipo - específico são altamente precisos para o diagnóstico sorológico principalmente da infecção em populações nas quais a prevalência da doença é alta (Mark *et al.*, 2007) como em gestantes HIV-positivas, mulheres profissionais do sexo e homens que fazem sexo com homens. (Da Silva *et al.*, 2015;)

Algumas estirpes de HHV-1 e de HHV-2 foram identificadas com mutações ou deleções no gene gG, levando à produção de formas truncadas dessa glicoproteína, o que dificulta o diagnóstico baseado nessa região (Daikoku *et al.*, 2013; Van Rooijen *et al.*, 2016). Infecções com tais variantes causaram lesões genitais semelhantes à infecção causada pelo vírus selvagem, mas a resposta imune ao gG foi reduzida ou ausente. A ausência de anticorpos específicos contra o HHV-1 e 2 não elimina uma infecção por esses vírus. A

detecção do DNA do HHV-1 e HHV-2 ou isolamento em cultura de células juntamente com uma sorologia negativa(IgM e IgG) podem sugerir a infecção primária com uma estirpe com alterações na gG (Legoff *et al.*, 2014).

1.7.3) Detecção do antígeno viral

1.7.3.1) Imunofluorescência (IF)

O antígeno viral pode ser facilmente detectado por ensaio de imunofluorescência direta ou indireta (IF) utilizando anticorpos monoclonais específicos marcados com fluoresceína. Geralmente, os ensaios de detecção de antígenos do HHV em lesões apresentam a mesma sensibilidade do que a cultura celular, mas sensibilidade inferior ao teste da amplificação de ácido nucléico (Reação em cadeia da polimerase - PCR) (Burrows *et al.*, 2002). Como o ensaio IF indireto e ELISA funcionam satisfatoriamente em pacientes sintomáticos, esses métodos diretos podem oferecer uma alternativa diagnóstica rápida em locais onde as instalações laboratoriais são limitadas e onde as condições de manipulação e transporte do espécime poderiam inativar o vírus. Isto é aplicado para locais remotos onde o tempo de transporte prolongado da amostra em condições impróprias pode ocorrer antes da entrega ao laboratório de microbiologia (Legoff *et al.*, 2014).

1.7.3.2) Reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real

Nas últimas décadas, as técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR), estão sendo cada vez mais utilizadas por sua capacidade de detectar pequenas quantidades de genoma viral (Schmutzhard *et al.*, 2004). Com a PCR é possível realizar a detecção do HHV-DNA com maior sensibilidade e rapidez do que com o isolamento viral (Filén *et al.*, 2004). O uso da PCR também possibilita realizar o diagnóstico em diferentes tipos de amostras clínicas, tais como: swab de lesão orolabial e genital, fluido cérebro espinhal (líquor), raspado cervical, líquido amniótico, soro ou plasma. A aplicação da PCR em tempo real no diagnóstico da infecção causada pelos HHVs vem crescendo nos últimos anos por ela ser uma técnica de detecção e quantificação de ácidos

nucléicos com alta sensibilidade, rapidez e minimização de contaminações (García-Aguirre e Cristina, 2008). A técnica de PCR em tempo real permite a detecção e quantificação do genoma viral em diferentes espécimes clínicos (Lima *et al.*, 2017; Wong *et al.*, 2016), sendo também bastante utilizada para a avaliação dos efeitos de candidatos a antiviral e genotipagem (Fujiwara *et al.*, 2011; Piret *et al.*, 2016; Rajtar *et al.*, 2017).

Diversos estudos têm demonstrado a sensibilidade e rapidez desta técnica para a diferenciação rápida e precisa do HHV-2. Esta técnica é principalmente interessante para a detecção do HHV DNA em amostras de pacientes assintomáticos, mostrando transmissão do HHV de forma inaparente. Estudos recentes têm mostrado, a partir da PCR em tempo real, a presença do genoma do HHV em amostras de saliva, soro e sangue do cordão umbilical de pacientes assintomáticos (Liljeqvist *et al.*, 2009; Ximenes *et al.*, 2010; Tronstein *et al.*, 2011; Perse Da Silva *et al.*, 2015; Tavakoli *et al.*, 2017).

1.7.3.3) Sequenciamento

Nas últimas décadas, a técnica de sequenciamento se destacou como uma importante ferramenta para a caracterização molecular dos HHVs, o que permitiu o estudo de diversidade genética e evolução destes vírus, além da sua aplicação para detecção genética de cepas resistentes aos antivirais comumente usados no tratamento das infecções herpéticas.

Os testes de resistência genotípica usualmente envolvem a amplificação e sequenciamento dos genes da timidina cinase (TK) e DNA polimerase. Os achados sugestivos de resistência incluem a detecção de mutações que promovem mudança no quadro de leitura, códons extras de parada e substituições não sinônimas dos genes conservados e funcionalmente importantes. A resistência ao aciclovir / valaciclovir / famciclovir está quase sempre associada a mutações não sinônimas do gene TK e raramente ao gene da DNA polimerase (Sauerbrei *et al.*, 2016).

1.8) Epidemiologia

Os vírus herpes 1 e 2 são distribuídos em todo o mundo e ambos têm sido reportados em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Looker, *et al.*, 2015). Os humanos são os únicos reservatórios de transmissão do HHV para os outros humanos. O vírus é transmitido de um indivíduo infectado para um suscetível durante contato pessoal íntimo. Como a infecção por ambos os vírus raramente é fatal e torna-se latente, mais da metade da população mundial já foi infectada pelo HHV-1 ou 2 e é capaz de transmitir o HHV-1 e 2 durante episódios de infecção produtiva (Roizman *et al.*, 2013)

Muitos adultos estão infectados com HHV, mas o sorotipo, a gravidade, as manifestações clínicas e o modo de transmissão variam com a idade. Crianças possuem como infecção primária manifestações orolabiais por HHV por volta dos 5 anos de idade, com a taxa de infecção variando entre 33% na população de baixo nível socioeconômico e 20% na população de elevado nível socioeconômico. Em jovens e adultos esta taxa varia entre 70% a 80% na população de baixo nível socioeconômico e 40% a 60% na população de elevado nível socioeconômico (Fatahzadeh e Schwartz, 2007).

O HHV-2 é amplamente disseminado pelo mundo e sua transmissão se dá quase que exclusivamente por via sexual, causando o herpes genital. Em 2012, foi estimado que 417 milhões de pessoas no mundo estivessem vivendo com o HHV-2. A prevalência da infecção na África foi de 31,5%, seguido pelas Américas (14,4%) (Looker *et al.*, 2015) (Figura 1.6).

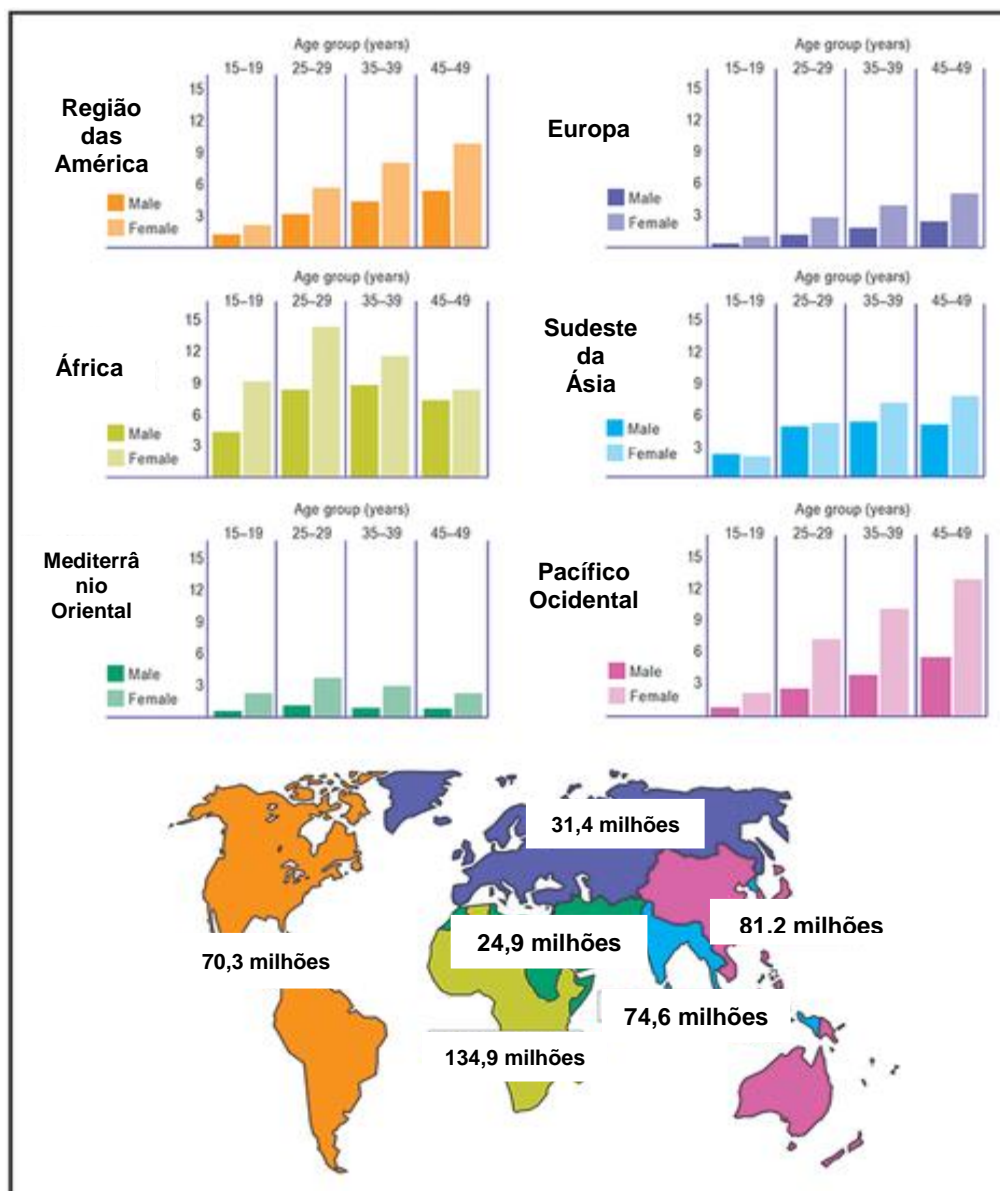


Figura 1.6: Estimativa do número de pessoas infectadas com o HHV-2 no mundo, divididas por sexo, idade e região. Adaptada de Looker *et al.*, 2015.

O aumento da prevalência do HHV-2 no mundo está associado com o aumento da idade, embora a maioria dos indivíduos recém-infectados seja adolescente. Estima-se que dos 417 milhões de infectados, 267 milhões sejam mulheres e 150 milhões homens. (Looker *et al.*, 2015). Isso ocorre porque a transmissão sexual dos HHV é mais eficiente dos homens para as mulheres do que das mulheres para homens (WHO, 2016).

Poucos estudos investigaram a prevalência do HHV na população brasileira. Em 2010, a prevalência do HHV-2 na população geral do Brasil foi de 11,3% (Clemens e Farhat, 2010) e dentre as cinco regiões brasileiras, a região Norte apresentou as maiores prevalências. Um estudo realizado no sudeste do país mostrou que a prevalência do HHV-2 em mulheres foi de 15,6% (Caldeira *et al.*, 2013) enquanto na região Norte do país a infecção genital por HHV-1 é quatro vezes mais prevalente do que a por HHV-2 (23,0% e 5,4% respectivamente) (Pereira *et al.*, 2012). Da Silva *et al.*, 2015 mostraram que a prevalência do HHV-1/2 em homens que fazem sexo com homens do Mato Grosso do Sul foi de 85,2%.

1.8.1) Epidemiologia do HHV em pacientes HIV positivos

Em 2015, existiam aproximadamente 36,7 milhões de pessoas vivendo com HIV (WHO, 2017). Estima-se que dois terços dos indivíduos infectados pelo HIV em todo o mundo estejam co-infectados com HHV-1/2, devido às vias semelhantes de transmissão (Zhang *et al.*, 2012). Estudos mostram que a detecção do HHV-1/2 ocorre mais frequentemente em pacientes infectados pelo HIV em comparação com indivíduos não co-infectados (Strick *et al.*, 2006; Van De Perre *et al.*, 2008).

O HHV-2 se destaca como uma das principais agente de infecções em indivíduos HIV positivos. Recentes estudos mostram que nesses indivíduos a co-infecção fica em torno de 48,6% a 68% (Nag *et al.*, 2015; Aebi-Popp *et al.*, 2016; Cohen *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2016). Um achado importante nas últimas décadas é o fato de que infecção pelo HHV-2 aumenta 3 a 4 vezes a probabilidade de adquirir o HIV, desta forma o HHV-2 vem contribuindo significativamente para as epidemias da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Barnabas *et al.*, 2011). Além disso, evidências mostram que o HHV-2 aumenta significativamente a disseminação do HIV na genitália dos co-infectados com esses vírus (Corey *et al.*, 2004). A relação entre o HIV e o HHV-2 é recíproca, uma vez que a infecção pelo HIV também aumenta a probabilidade de adquirir HHV-2, e que a reativação do HHV-2 é mais frequente em pacientes HIV positivos (Mayaud *et al.*, 2009).

1.9) Epidemiologia molecular

Estudos sobre a evolução e a diversidade do genoma do HHV-2 no mundo são escassos e são baseados, principalmente, na divergência entre as sequências nucleotídicas dos genes que codificam as glicoproteínas do envelope viral.

A análise dos genes que codificam as glicoproteínas de 47 isolados do HHV-2 provenientes da Europa e África evidenciaram que o HHV-2 apresenta menor variabilidade genética que o HHV-1 (Noberg *et al.*, 2007). Este achado corrobora com a análise evolutiva dos genes da gB do HHV-2 que o revela como um vírus mais novo quando comparado ao HHV-1, pois divergiu há menos de 2 milhões de anos do seu ancestral comum, o Herpes chimpanzé (ChHV), enquanto o HHV-1 divergiu à cerca de 6 milhões de anos atrás (Wertheim *et al.*, 2014).

Estudos filogenéticos com isolados do HHV-2 provenientes da Europa, América do Norte, África e Ásia sugerem a presença de dois clados genéticos, denominados A e B, baseados inicialmente na análise das regiões US4, US7-8 e UL-27 que codificam as glicoproteínas G, I, E e B (Norberg *et al.*, 2007; Schmidt-Chanasit *et al.*, 2010) (Figura 1.7). Recentemente, foi sugerido pela

comunidade científica classificar o HHV-2 em genogrupos distintos de acordo com a origem geográfica das cepas, assim como foi proposto para o HHV-1 (Szpara *et al.*, 2014), porém um estudo que avaliou o genoma completo de 34 cepas de diferentes regiões geográficas demonstrou não existir diversidade genética suficiente para dividir o HHV-2 em genogrupos (Newman *et al.*, 2015).



Figura 1.7. Distribuição geográfica dos clados genéticos do HHV-2. Por Lima *et al.*, 2017.

Apesar da diversidade intraespecífica do HHV-2 ser inferior a 0,5%, estudos recentes reportam a emergência de 14 cepas variantes que exibiram até 2,4% de divergência dentro da região genômica que codifica a DNA polimerase (UL30) e o ICP8 (UL29) (Burrell *et al.*, 2013; 2015). A recente análise filogenética e de recombinação da região da UL15, UL29, UL30 e UL39 das variantes do HHV-2 e de cepas previamente caracterizadas sugeriu uma origem africana para o HHV-2 e revelou a existência de duas linhagens, na qual uma delas se dispersou para fora da África e recombinau com HHV-1 enquanto a outra se restringiu a África subsaariana (Burrell *et al.*, 2017).

1.10) Prevenção e Tratamento

A melhor forma de prevenir as infecções causadas pelo HHVs é evitar a exposição aos vírus. Para evitar a herpes genital, o uso do preservativo protege do contato com a região genital infectada ou o contato com secreções genitais. A abstinência sexual é sugerida para indivíduos soronegativos com parceiros soropositivos que estejam apresentando lesões genitais. Para a prevenção da transmissão viral durante a gravidez, ambos os parceiros devem ser informados sobre o seu estado sorológico e as possíveis consequências da transmissão viral, tanto com o herpes genital sintomático como com a eliminação viral assintomática. A psicoterapia pode ajudar a reduzir o número de recidivas do herpes genital em mulheres grávidas com altos níveis de estresse emocional (Roizman *et al.*, 2013).

Como a maioria dos casos de herpes neonatal resulta da exposição ao HHV quando a criança passa pelo canal de parto, o parto cesariano é sugerido para as mães soropositivas com lesões genitais ativas, primárias ou recorrentes (Engelberg *et al.*, 2003). Esta prática reduz o risco de infecção do bebê, mas não o elimina totalmente (Brown *et al.*, 2003; Engelberg *et al.*, 2003). A cesariana deve ser realizada antes da ruptura das membranas, se a ruptura já ocorreu e as lesões genitais estão presentes, a cesariana ainda é recomendada. A cesariana não é recomendada para mulheres com história de herpes genital recorrente, mas sem lesões ativas ou com sintomas prodrômicos no momento do parto (James e Kimberlin, 2015).

Até o presente momento, não há nenhuma vacina licenciada contra o herpes genital, embora existam muitos estudos de desenvolvimento de vacinas terapêuticas e profiláticas. As vacinas terapêuticas visam prevenir infecções recorrentes pelo HHV e episódios de eliminação viral assintomática em pessoas infectadas, já as vacinas profiláticas destinam-se a prevenir a infecção primária e a subsequente latência do vírus. O principal alvo das vacinas é o HHV-2 (Sauerbrei, 2016).

Um grande número de vacinas já foi testada em modelos animais (Stanfield *et al.*, 2017) e atualmente, as vacinas constituídas de proteínas virais recombinantes e de subunidade parecem ser as mais promissoras (Odegard *et al.*, 2016; Awasthi *et al.*, 2017). Alguns ensaios de vacinas de subunidade proteica e vacinas de vírus vivo atenuado não produziram resultados suficientemente convincentes em humanos para justificar o licenciamento, pois dificuldades significativas na redução do número de recorrências e na prevenção da infecção genital primária com HHV-1 e HHV-2 foram verificadas nestas candidatas (De Bruyn *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2015).

O aciclovir (ACV) é um análogo da desoxiguanosina com uma cadeia lateral acíclica que não possui o grupo 3'-hidroxila presente nos nucleosídeos naturais (Wagstaff *et al.*, 1994). Ele é um pró-fármaco convertido pela timidina kinase (TK) em ACV-monofosfato (ACVMP) (Balfour, 1983). Sendo assim, ao ser fosforilada pela timidina kinase viral, a molécula é captada pela DNA polimerase viral resultando na terminação de cadeia da fita de DNA, pela ausência do 3'-OH (De Clercq, 2004).

A biodisponibilidade do aciclovir é de apenas 15-30% com administração oral. As infecções de pele e mucosas, incluindo o herpes genital, podem ser tratadas oralmente em indivíduos imunocompetentes. As infecções graves por HHV, particularmente em pacientes imunodeficientes e neonatos, devem ser tratadas com aciclovir intravenoso (Sauerbrei, 2016) e a dosagem do aciclovir para o tratamento do herpes genital é dependente do estado da infecção, da competência imunológica e do fato do paciente estar ou não gestante. Se as recorrências ocorrem a uma taxa mais de quatro a seis episódios por ano o tratamento em longo prazo deve ser considerado (Patel *et al.*, 2011; Workowski *et al.*, 2015). Os benefícios da profilaxia têm sido provados particularmente durante a gravidez. O aciclovir tópico só é recomendado para o herpes labial, ceratoconjuntivite herpética e herpes genital ligeiramente sintomático. Oficialmente o aciclovir não é licenciado para uso durante a gravidez, embora a administração deva ser evitada particularmente antes da 15ª semana de gestação (Sauerbrei, 2016).

O valaciclovir é um pró-fármaco de aciclovir adequado para administração oral. Após a ingestão, é convertido em aciclovir pela enzima hepática valaciclovir hidrolase. O valaciclovir oral tem uma biodisponibilidade de 54%, alcançando concentrações de três a quatro vezes maiores que o aciclovir oral. Isto permite maiores intervalos de dose e está associado a uma melhor adesão. O valaciclovir é também um tratamento padrão para o herpes genital em doentes imunocompetentes e estudos têm demonstrado a sua eficácia na supressão viral e na prevenção do herpes genital recorrente (Hollier e Wendel, 2008).

O fanciclovir é o pró-fármaco de éster de diacetilo inativo do único análogo de nucleótido acíclico, o penciclovir, que surge após a clivagem de dois grupos éster no intestino delgado e no fígado. A biodisponibilidade do fanciclovir é de 77% após aplicação oral. O fanciclovir também é considerado um dos agentes terapêuticos padrão para o herpes genital, juntamente com aciclovir e valaciclovir, e também não está licenciado para uso em crianças e adolescentes, pacientes imunossuprimidos com idade inferior a 25 anos ou na gravidez. Por conseguinte, não deve ser utilizado como tratamento de escolha na gravidez (Kang *et al.*, 2011).

O foscarnet é um análogo de pirofosfato que se liga de forma reversível perto do local de ligação do pirofosfato na DNA polimerase (ou transcriptase reversa). Após a ligação, o fármaco bloqueia a clivagem da porção pirofosfato dos desoxinucleotídeos trifosfatos e assim interrompe o alongamento da cadeia de DNA (Brady e Bernstein, 2004; Dambrosi *et al.*, 2010).

A falha do tratamento é definida como falta de resposta ao tratamento antiviral (geralmente aciclovir / valaciclovir) no prazo de 10 dias. Nestes casos, deve-se suspeitar de infecção por uma cepa resistente e realizar testes de resistência fenotípica e / ou genotípica. Na presença de resistência ao aciclovir / valaciclovir, que está quase sempre associada à resistência cruzada ao fanciclovir, está indicado o tratamento alternativo com foscarnet (Sauerbrei *et al.*, 2016).

1.11) Herpes genital em mulheres profissionais do sexo

Mulheres que atuam como profissionais do sexo (MPS) apresentam um grande número de parceiros sexuais ao longo da vida, o que faz com que estas estejam mais expostas à infecções sexualmente transmissíveis (IST) se não forem tomadas medidas de prevenção e controle. Estudos recentes vêm demonstrando uma alta prevalência de doenças sexualmente transmissíveis e da infecção pelo HIV em profissionais do sexo (Aho *et al.*, 2014; Merrigan *et al.*, 2015; Moayedi-Nia *et al.*, 2016).

As MPS destacam-se como um grupo de grande importância, pois elas se comportam como uma ponte para a transmissão sexual de IST e HIV de um grupo de alto risco para a população geral (Wang *et al.*, 2011). A maioria dos estudos recentes que investigam a soroprevalência do HHV-2 em MPS é de diferentes províncias da China (Wang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2016). A falta de informações acerca desta infecção em outras partes do mundo dificulta o planejamento de políticas públicas de controle e prevenção da infecção neste grupo.

Em um estudo realizado na China, 27.8% das mulheres profissionais do sexo eram infectadas pelo HHV-2, dentro deste grupo as profissionais que cobravam preços altos apresentaram maior prevalência da infecção do que nas que cobravam preços médios (Han *et al.*, 2016). Entre MPS chinesas e vietnamitas da fronteira de Hekou (China), a prevalência do HHV-2 foi de 58,3%. (Wang *et al.*, 2012). Recentemente no Canadá, um estudo realizado com MPS mostrou que a taxa de incidência do HHV-2 era quase 4 vezes maior naquelas que usavam contraceptivo injetável (Socias *et al.*, 2016).

No Peru, em um estudo realizado com 4485 MPS e 15261 adultos jovens 60,6% das MPS e 13,5% dos adultos jovens estavam infectadas pelo HHV-2. A grande diferença entre as soroprevalências confirmam que a população de MPS é de alto risco, orientando então o direcionamento de intervenções para as IST (Cárcamo *et al.*, 2012).

1.12) Herpes genital em gestantes e herpes neonatal

A infecção genital em mulheres gestantes é tão comum quanto em mulheres não gestante da mesma idade. Entretanto a infecção em gestantes merece mais atenção devido ao risco de transmissão para o feto ou neonato (Roizman *et al.*, 2013). Estudos soro epidemiológicos conduzidos com mulheres grávidas demonstram que a prevalência neste grupo varia de acordo com a região geográfica estudada. Na Nigéria, 99,4% das mulheres gestantes apresentavam anticorpos contra o HHV-1/2 (Okonko e Cooney, 2015) e na Etiópia 32,1% das gestantes estudadas eram soropositivas para o HHV-2. Na Suíça e na Finlândia 79,4% e 45%, respectivamente, foram soropositivas para o HHV-2 (Kucera *et al.*, 2012; Puhakka *et al.*, 2016). Em gestantes HIV positivas, as prevalências geralmente são mais altas. Em um estudo recente realizado na Ucrânia 68% das gestantes foram coinfectadas pelo HIV e HHV-2 (Aebi-Popp *et al.*, 2016) e nos EUA a soroprevalência do HHV-2 entre gestantes HIV positivas foi de 71% (Patterson *et al.*, 2011).

Aproximadamente 75% das mulheres com história de herpes genital causada por HHV-2 e adquirida antes da gravidez possuem pelo menos um caso de recorrência durante a gravidez e 14% desenvolvem sintomas específicos ou lesões antes do parto (Sheffield *et al.*, 2006). Em um estudo realizado em 2011, mulheres gestantes coinfectadas pelo HIV/HHV-2 eliminaram mais frequentemente o HHV-2 na região genital durante o parto que gestantes não infectadas pelo HIV (Patterson *et al.*, 2011).

Mulheres sem anticorpos para HHV têm 4% de chance de adquirir a infecção durante a gestação, enquanto mulheres com anticorpos apenas para HHV-1 têm 2 % de chance de adquirir HHV-2 durante a gestação (Brown *et al.*, 1997). A infecção genital primária de uma mulher grávida durante o último trimestre de gestação é o principal fator de risco para o desenvolvimento do herpes neonatal (Corey e Wald, 2009; Cherpes *et al.*, 2012). A eliminação assintomática do HHV também é um dos principais fatores que levam à transmissão vertical, já que na maioria dos casos de herpes neonatal, não há história conhecida de infecção genital materna porque as mães nunca tiveram ou nunca notaram as lesões genitais externas. Estudos mostram que 75% a 90%

dos indivíduos que são soropositivos para HHV-2 não estavam cientes de sua infecção (Gardella e Brown, 2011; James e Kimberlin, 2015).

Apesar das consequências graves associadas ao herpes neonatal, a incidência da doença é rara quando comparada com a prevalência do HHV. Nos EUA, estima-se que ocorram cerca de 1500 casos por ano de herpes neonatal (Kimberlin, D. W., 2004). Na Holanda, a incidência do herpes neonatal entre 2006 e 2011 foi de 4,7 a cada 100.000 nascimentos, no reino Unido entre 2006 e 2012, a taxa encontrada foi de 17,5 por 100.000 nascidos vivos, enquanto na Austrália a incidência do herpes genital entre 1997 a 2011 foi de 3,27 casos por 100.000 nascidos vivos (Batra *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2014; Hemelaar *et al.*, 2015; Looker *et al.*, 2017).

A transmissão materna do herpes para o neonato ou feto pode acontecer por três vias diferentes: *in utero* (5% dos casos), relacionado a presença de viremia materna; *peri partum* (85% dos casos) a partir de uma infecção transplacentária ascendente ou por disseminação retrógrada através de membranas amnióticas intactas ou rompida, e *pos partum* (5% dos casos) é geralmente adquirida a partir do contato direto com uma pessoa infectada pelo HHV, geralmente com lesões cutâneas ou orolabiais (James e Kimberlin, 2015).

In utero (infecção congênita), a transmissão do HHV ocorre tanto em infecções maternas primárias como em recorrentes. A transmissão do HHV por via congênita é rara e quando o HHV é transmitido por esta via, a infecção apresenta uma tríade de manifestações clínicas características no recém-nascimento: achados cutâneos (lesões ativas, cicatrizes, aplasia cutis, hiperpigmentação ou hipopigmentação); achados neurológicos (microcefalia, calcificações intracranianas, hidrocefalia); e achados oculares (coriorretinite, microftalmia, atrofia óptica) (James e Kimberlin, 2015).

A transmissão *peri partum* pode ocorrer quando houver vírus replicando no trato genital próximo ao momento do parto. Cerca de 75% dos casos de herpes neonatal são adquiridos durante o parto, a partir de uma infecção genital materna recém-adquirida e assintomática (Corey e Wald, 2009). A infecção pós-natal pode ser adquirida a partir da mãe do bebê ou de fontes não maternas como, por exemplo, parentes ou trabalhadores do próprio hospital

com herpes orolabial ou eliminação assintomática do HHV-1 (Pickering, *et al.*, 2012; Kimberlin, 2004).

As manifestações clínicas das infecções transmitidas *peri partum* e pós-parto podem ser categorizadas em: infecção disseminada; infecção do sistema nervoso central e infecção de pele, olhos e membranas mucosa (SEM). A infecção SEM é responsável por aproximadamente 45% das infecções neonatais causadas por HHV e, nestas infecções, não há envolvimento do sistema nervoso central ou outros órgãos. As infecções do sistema nervoso central representam cerca de 30% das infecções neonatais causadas por HHV, os neonatos podem apresentar lesões mucocutâneas, mas não têm evidências de comprometimento de outros órgãos. A infecção do sistema nervoso central pode resultar em encefalite e meningite levando a graves danos neurológicos, tais como atraso mental e sequelas significativas e até mesmo a morte (Kimberlin *et al.*, 2001). A doença disseminada corresponde a 25% das manifestações clínicas do herpes neonatal. A infecção disseminada por HHV pode envolver vários órgãos, incluindo o fígado, os pulmões, as supra-renais, o trato gastrointestinal, a pele, olhos e boca (Major *et al.*, 2003).

Além do herpes genital e do risco de transmissão neonatal, alguns estudos mostram manifestações raras associada à infecção do HHV durante a gestação, como a hepatite fulminante (Holt *et al.*, 2013), encefalite (Dodd *et al.*, 2015) e a infecção disseminada que pode se apresentar como sepse viral e pneumonia (Frederick *et al.*, 2002).

2) JUSTIFICATIVA

Os herpesvírus humanos 1 e 2 (HHV-1 e HHV-2) são os patógenos com maior taxa de transmissão sexual entre mulheres adultas (Anzivino *et al.*, 2009; Smith e Roberts, 2009), e o HHV-2 é o principal causador do herpes genital no mundo. Estima-se que das 417 milhões de pessoas infectadas, 267 milhões sejam mulheres (WHO, 2016).

As mulheres desempenham um papel importante na dinâmica de infecção do HHV-2, pois elas podem transmitir o vírus tanto por via sexual quanto pela via vertical. Mulheres que atuam como profissionais do sexo (MPS) sempre se destacaram como um grupo de alto risco para as IST devido ao grande número de parceiros sexuais ao longo da vida. Estudos mostram que a prevalência do HHV-2 em MPS é alta (Wang *et al.*, 2012; Cárcamo *et al.*, 2012) e, apesar desse grupo ser muito estudado, não existem estudos que investiguem a infecção do HHV-2 em mulheres profissionais do sexo no Brasil, o que dificulta o desenvolvimento de intervenções específicas neste grupo.

A maior incidência da infecção por HHV ocorre em mulheres em idade reprodutiva, e a transmissão potencial para o feto durante a gravidez tornou-se um importante problema de saúde (WHO, 2016). Por isso a população de mulheres gestantes também se destaca como um grupo importante para o controle da transmissão. Além disso, a presença da infecção causada pelo HIV aumenta a probabilidade de adquirir HHV-2 (Aboud *et al.*, 2008) e em indivíduos coinfectados HIV/HHV-2, a reativação do HHV-2 é mais frequente (Mayaud *et al.*, 2009). Em gestantes coinfectadas, a eliminação do HHV no trato genital durante o parto é mais frequentemente do que em gestantes não coinfectadas (Patterson *et al.*, 2011) e desta forma, sugere-se que a presença do HIV em gestantes com HHV-2 pode aumentar o risco de transmissão vertical do HHV-2.

O diagnóstico laboratorial dos herpesvírus é classicamente realizado por isolamento viral em cultura de células, assim o advento das técnicas moleculares impactou diretamente no diagnóstico destes vírus. A PCR em tempo real é uma técnica altamente sensível e específica, e, além de oferecer um diagnóstico rápido, permite a quantificação de partículas virais. Para realizar esta

quantificação é necessária intensa padronização da curva padrão, que nem sempre pode ser realizada nos laboratórios devido a falta de estrutura, desta forma é necessário buscar novas alternativas de curvas a fim de ampliar a utilização desta técnica.

Pouco se sabe sobre a caracterização molecular do HHV-2 no mundo. Até o presente momento, não existem descrições de cepas circulantes na população da América Latina. O conhecimento da diversidade nucleotídica e proteica do HHV-2 pode contribuir para o desenvolvimento de vacinas, métodos diagnósticos, avaliação das manifestações clínicas e transmissão do HHV-2.

Visto a importância das mulheres para a epidemiologia do HHV-2 e a escassez de trabalhos publicados no Brasil que englobam as infecções causadas pelos HHV-2, este estudo visou avaliar o uso da curva sintética com curva padrão para o diagnóstico do HHV-2 utilizando a PCR quantitativa, além de investigar marcadores da infecção do HHV-2 e caracterizar molecularmente as cepas do HHV-2 circulantes em diferentes populações de mulheres: profissionais do sexo, gestantes portadoras do HIV e gestantes não portadoras do HIV. Os dados obtidos com esses estudos poderão ser utilizados para facilitar o diagnóstico da infecção e a implantação de medidas de prevenção e controle do HHV-2 em mulheres em idade sexualmente ativa.

3) OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar aspectos epidemiológicos, laboratoriais e moleculares do Herpesvírus humano 2 em duas populações de mulheres.

Objetivos específicos

- Avaliar o uso da curva sintética do HHV-1 e HHV-2 como curva padrão para a quantificação absoluta destes vírus por PCR em tempo real (Artigo1);
- Estimar a prevalência, presença de viremia e comportamento de risco associados ao HHV-2 em mulheres profissionais do sexo do Mato Grosso do Sul (Artigo 2);
- Estimar a prevalência e presença de viremia do HHV-2 em gestantes não-portadoras do HIV do Rio de Janeiro (Artigo 3);
- Estimar a prevalência da coinfeção HHV-2/HIV-1, a presença de viremia e avaliar a relação entre os comportamentos de risco e a prevalência do HHV-2 em gestantes do Rio de Janeiro (Artigo 4);
- Caracterizar molecularmente cepas do HHV-2 circulantes em mulheres HIV positivas e negativas do Rio de Janeiro (Artigo 5).

4) RESULTADOS

Os resultados dessa tese serão apresentados na forma de artigos científicos e discutidos na ordem que serão apresentados abaixo

- 1) Lima, LRP.; da Silva, AP; Schmidt-Chanasit, J.; de Paula, VS. Diagnosis of human herpes virus 1 and 2 (HHV-1 and HHV-2): use of a synthetic standard curve for absolute quantification by real time polymerase chain reaction. 2017. Mem Inst Oswaldo Cruz. 112: 1-4.
- 2) L.R. Lima, N.A Araújo, A.S Silva, V. Mello; A.S.Perse, G.J. Mousquer, F.R Pires, M.A. Puga; G.R.Rezende; T.S.C.O.Tanaka, L.S. Castro² A.R.C Motta-Castro; V.S. de Paula. Human herpesvirus 2 among female sex workers from Central Brazil: seroprevalence, risk factors and viremia detection. (em confecção)
- 3) Lima, LRP; Padalecki, G; Velasco-de-Castro, CA; Cordeiro, JA; de Paula, VS. Seroprevalence of human herpesvirus type 2 in a reference site for pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil. Virus Research and Research. 2017. 22:20-21
- 4) Lima, LRP.; Fernandes, LEBC.; Villela, DAM.; Morgado MG.; Pilotto, JH. de Paula, VS. Co-infection of human herpesvirus type 2 (HHV-2) and human immunodeficiency virus (HIV) among pregnant women from Rio de Janeiro, Brazil. 2017. AIDS CARE. 15:1-5.
- 5) Lima, LRP; Araújo, NA; Guterres, A; da Silva A.P; Pilotto, JH; de Paula VS. Glycoprotein B gene sequencing of human herpesvirus 2 strains from Brazilian HIV-1 coinfecting subjects suggests the existence of a new clade. (submetido para Virus Research em junho de 2017)

Diagnosis of human herpes virus 1 and 2 (HHV-1 and HHV-2): use of a synthetic standard curve for absolute quantification by real time polymerase chain reaction

Lyana Rodrigues Pinto Lima¹, Amanda Perse da Silva¹, Jonas Schmidt-Chanasit², Vanessa Saete de Paula^{1,*}

¹Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
²Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Diagnostic Virology Laboratory, Hamburg, Germany

The use of quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) for herpesvirus detection has improved the sensitivity and specificity of diagnosis, as it is able to detect shedding episodes in the absence of clinical lesions and diagnose clinical specimens that have low viral loads. With an aim to improve the detection and quantification of herpesvirus by qPCR, synthetic standard curves for human herpesvirus 1 and 2 (HHV-1 and HHV-2) targeting regions gD and gG, respectively, were designed and evaluated. The results show that synthetic curves can replace DNA standard curves in diagnostic herpes qPCR.

Key words: real time PCR - synthetic curve - herpes

The human herpesvirus or herpes simplex virus (HHV or HSV) is a neurotropic virus that has two distinct serotypes, human herpesvirus 1 and 2 (HHV-1 and HHV-2). Although both viruses are closely related, they contain sufficient differences to enable type identification (Nicoll et al. 2012). Historically, HHV-1 was considered the main cause of orolabial lesions, and HHV-2 was most commonly associated with genital infections. However, HHV-1 is increasingly being detected in genital lesions, and HHV-2 in orolabial lesions (Bhat-tarakosol et al. 2005). HHV is highly prevalent in many countries, and HHV infection is a global public health problem (Looker et al. 2015). Cell culture is the classic method used in the laboratory to diagnose herpes infection; however, this method is time-consuming and has low sensitivity (Curtin et al. 2013).

The ability to detect nucleic acid has had a major impact on clinical virology diagnosis (Niesters 2002). Polymerase chain reaction (PCR) is widely used in HHV research, and among the available PCR methods, quantitative real time PCR (qPCR) has the advantages of speed and quantification. In qPCR, the viral load is measured as the copy number per cell or percentage of total DNA by using a standard curve. A standard curve is generated by qPCR using a dilution series of a DNA template, which is commonly generated from plasmid DNA or DNA oligonucleotides (Tourinho et al. 2015). The advantage of using DNA oligonucleotides is that only the nucleotide sequence needs to be synthesized. For laboratories that do not have enough space or funding for

molecular cloning, synthetic curves could be used as an alternative for quantification (Tourinho et al. 2015). Based on these advantages, the aim of this study was to evaluate the potential use of a DNA synthetic oligo as a standard for HHV-1 and HHV-2 quantification.

HPLC-purified oligonucleotides representing an 84-bp sequence of glycoprotein D in HHV-1 and a 91-bp sequence of glycoprotein G in HHV-2 were synthesized (Table I). The DNA oligonucleotides were diluted in DNase/RNase-free distilled water to 100 pmol/ μ L, which is approximately 10^{11} DNA molecules/ μ L, according to Avogadro's number (Tourinho et al. 2015). These templates were evaluated by qPCR using the primers and probes previously described by Weidmann et al. (2008). Each qPCR contained 12.5 μ L of TaqMan[®] Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 2 μ M of each primer, 1.5 μ M of probe, and DNase- and RNase-free H₂O. The cycling conditions were as follows: 95°C for 10 min (initial denaturation and polymerase activation) followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, and annealing and extension at 60°C for 60 s. In this study, the standard curves were replaced with a ten-fold dilution series (10^0 - 10^{10}) of Ultramer[®] oligonucleotides. After determining the dilution range for each synthetic curve, they were assayed along with DNA for use as a standard curve to quantify virus in copies/ μ L.

Each dilution of the HHV-1 and HHV-2 synthetic curves was compared to the DNA standard curve from virus preparations (quantification range was 10^0 - 10^8 copies/ μ L). First, the cycle thresholds (CT) of the viral DNA and synthetic oligo curves for both viruses (HHV-1 and HHV-2) were compared. For HHV-1, the CT differences between the DNA and synthetic curves were 0.29-1.28, and for HHV-2, the differences were 0.18-1.1. The amplification efficiency values were $E = 97.2\%$ (slope = -3.432, $R^2 = 0.996$), with a detection limit of 10^2 copies/ μ L for the HHV-1 synthetic curves, and $E = 98.4\%$ (slope = -3.285, $R^2 = 0.998$), with a detection limit

doi: 10.1590/0074-02760160354

Financial support: PAPER V1 (407450/2012-1 - APQ), FAPERJ.

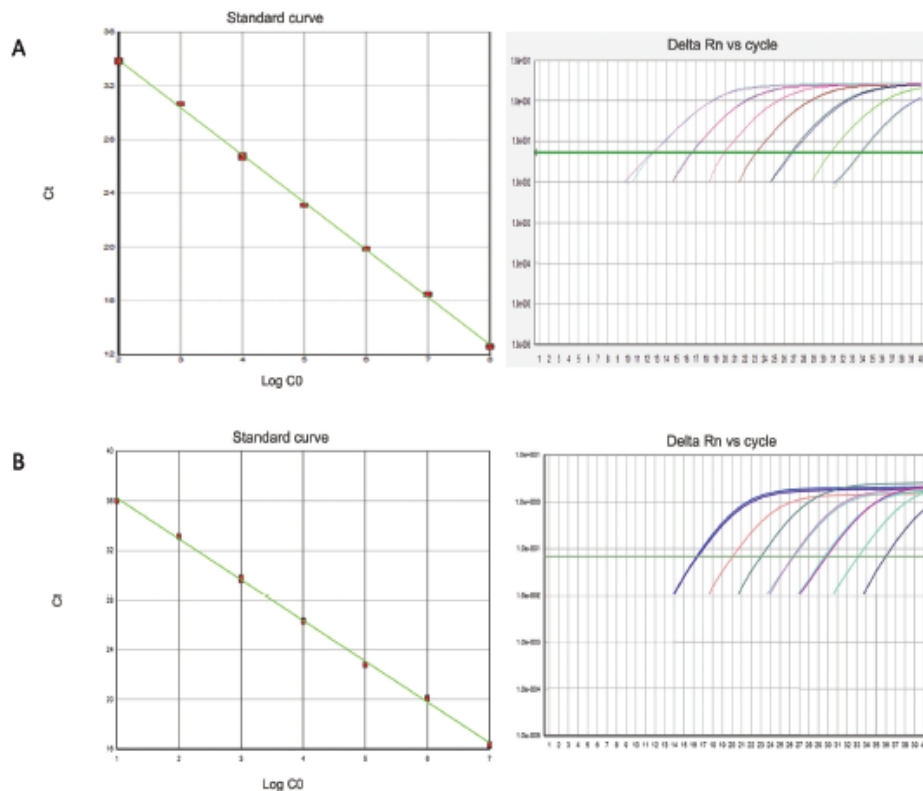
* Corresponding author: vdepaula@ioc.fiocruz.br

Received 4 August 2016

Accepted 23 November 2016

TABLE I
Human herpesvirus-1 (HHV-1) and Human herpesvirus-2 (HHV-2) synthetic (oligo) standard curves

Synthetic ultramer	Sequence	Size (pb)	Amount of oligo (nmoles)
HHV-1	5'-TTCGTCTCGTAAAATGGCCCTCCCGTATGGTTC-GTCGGTGTGGTCCGGTATGGATGCGTCGATAGTGCA-CACGGCCGCTGATA-3'	91	4.4
HHV-2	5'-ATGCTATCTACCCACACACAGACCCACGTAC-GATCTGGTATCTGGTACTCGAATGCTCCGCGCATG-CAGGAAGCATTACGAGAGCGCTGATC-3'	84	2.8



Amplification plots on a log scale and standard curves. (A) Human herpesvirus-1 (HHV-1); (B) human herpesvirus-2 (HHV-2).

of 10^1 copies/ μL for the HHV-2 synthetic curves (Figure). The standard curve included seven dilution points, and the quantification ranged from 10^2 to 10^8 copies/ μL for HHV-1 and from 10^1 to 10^7 copies/ μL for HHV-2.

After evaluating the synthetic standard curves, they were used to quantify HHV-1 and HHV-2 levels in 33 clinical samples by real time qPCR as described above. The 33 samples, which were previously tested by qualitative PCR and with known viral loads, included 15 clinical

samples of HHV-1 (two from cell culture, five lesions, five serum samples, and three saliva samples) and 18 clinical samples of HHV-2 (two from cell culture, three lesions, eight serum samples, two saliva samples, and three cervical scrapes). The assay results did not exhibit any discordance by quantitative or qualitative PCR. Furthermore, when DNA samples (each with 20 ng of DNA) from different sources were tested with both standard curves, the absolute quantification did not exceed one log (Table II).

TABLE II

Comparison of the absolute quantification of human herpesvirus-positive (HHV) samples using synthetic and DNA standard curves

HHV-1			HHV-2		
Samples	DNA curve (copies/uL)	Synthetic curve (copies/uL)	Samples	DNA curve (copies/uL)	Synthetic curve (copies/uL)
Lesion 1	1.3x10 ⁶	2.5x10 ⁶	Cervical scrape 1	7.8x10 ⁵	6.7x10 ⁵
Lesion 2	1.5x10 ⁴	2.9x10 ⁴	Cervical scrape 2	1.9x10 ⁴	1.0x10 ⁴
Lesion 3	5.7x 10 ⁶	7.1x10 ⁶	Cervical scrape 3	7.9 x 10 ⁴	6.8x10 ⁴
Serum 1	3.2x10 ³	4.3x10 ³	Serum 1	2.1.x10 ³	5.3x10 ³
Serum 2	1.0 x10 ⁰	1.9x10 ⁰	Serum 2	2.9x10 ²	3.5x10 ²
Serum 3	4.6x10 ¹	3.8x10 ¹	Serum 3	5.9x10 ⁰	6.7x10 ⁰
Serum 4	2.7x10 ¹	1.9x10 ¹	Serum 4	6.8x10 ²	7.6x10 ²
Serum 5	2.7x10 ²	1.8x10 ²	Serum 5	1.7x10 ¹	4.7x10 ¹
Cell culture 1	8.9x10 ⁷	9.5x10 ⁷	Serum 6	5.2 x10 ¹	8.3x10 ¹
Cell culture 2	6.6x10 ⁷	7.8x10 ⁷	Serum 7	3.4x10 ²	4.3x10 ²
Saliva 1	7.4x10 ³	8.7x10 ³	Serum 8	6.6x10 ²	7.4x10 ²
Saliva 2	3.2x10 ³	4.4x10 ³	Cell culture 1	9.4x10 ⁶	7.5x10 ⁶
Saliva 3	5.9x10 ³	7.1x10 ³	Cell culture 2	3.2x10 ⁷	2.4x10 ⁷
-	-	-	Saliva 1	2.9x10 ²	3.8x10 ²
-	-	-	Saliva 2	9.1x10 ²	9.8x10 ²
-	-	-	Lesion 1	7.5x10 ⁵	6.3x10 ⁵
-	-	-	Lesion 2	3.3x10 ⁶	1.5x10 ⁶
-	-	-	Lesion 3	2.2x10 ⁵	1.0x10 ⁵

Other authors have described improvements in the sensitivity and specificity of HHV diagnosis, and they were able to detect shedding episodes in the absence of clinical lesions (Aliabadi et al. 2015, da Silva et al. 2015, Bohórquez et al. 2016, Phipps et al. 2016, Ramchandani et al. 2016) and diagnose clinical specimens that had a viral load lower than lesion swabs, such as cerebral fluid, plasma (Tang et al. 2010), saliva, and cervical scrapes, as was demonstrated in the present study.

The use of this synthetic curve is currently limited to scientific research laboratories. However, previous studies have shown that oligonucleotides are good alternatives for quantification methods (Bowers & Dhar 2011, Tourinho et al. 2015). This study demonstrated that synthetic curves could be used as alternative standard curves for HHV diagnosis, since they showed similar results when compared to viral DNA curves.

AUTHORS' CONTRIBUTION

LRPL and APS developed the methodology, performed the analysis and wrote the manuscript; JS-C - design the standard curve and critical revision of the manuscript; VSP - conception, data analysis, critical revision and final approval of the version to be published.

REFERENCES

Aliabadi N, Jamalidoust M, Asaei S, Namayandeh M, Ziyaeyan M. Diagnosing of herpes simplex virus infections in suspected patients using real-time PCR. *Jundishapur J Microbiol.* 2015; 8(2): e16727.

Bhattarakosol P, Visaprom S, Sangdara A, Mungmee V. Increase of genital HSV-1 and mixed HSV-1 and HSV-2 infection in Bangkok, Thailand. *J Med Assoc Thai.* 2005; 88(Suppl. 4): S300-4.

Bohórquez SP, Díaz J, Rincón CM, Estupiñán M, Chaparro M, Low-Calle AM, et al. Shedding of HSV-1, HSV-2, CMV, and EBV in the saliva of hematopoietic stem cell transplant recipients at Fundación HOMI - Hospital de la Misericordia, Bogotá, DC. *Biomedica.* 2016; 36(1): 201-10.

Bowers RM, Dhar AK. Effect of template on generating a standard curve for absolute quantification of an RNA virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes.* 2011; 25(1): 60-4.

Curtin WM, Menegus MA, Patru MM, Peterson CJ, Metlay LA, Mooney RA, et al. Midtrimester fetal herpes simplex-2 diagnosis by serology, culture and quantitative polymerase chain reaction. *Fetal Diagn Ther.* 2013; 33(2): 133-6.

da Silva AP, Lopes AO, Vieira YR, de Almeida AJ, Sion FS, Grin-sztejn B, et al. Genotypic characterization of herpes simplex virus type 1 isolates in immunocompromised patients in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS ONE.* 2015; 10(9): e0136825.

Looker KJ, Magaret AS, Turner KM, Vickerman P, Gottlieb SL, Newman LM. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. *PLoS ONE.* 2015; 10(5): e0149889.

Nicoll MP, Proença JT, Efstathiou S. The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiol Rev.* 2012; 36(3): 684-705.

Niesters HG. Clinical virology in real time. *J Clin Virol.* 2002; 25(Suppl. 3): S3-12.

Phipps W, Nakku-Joloba E, Krantz EM, Selke S, Huang ML, Kambugu F, et al. Genital herpes simplex virus type 2 shedding among

- adults with and without HIV infection in Uganda. *J Infect Dis.* 2016; 213(3): 439-47.
- Ramchandani M, Kong M, Tronstein E, Selke S, Mikhaylova A, Magaret A, et al. Herpes simplex virus type 1 shedding in tears and nasal and oral mucosa of healthy adults. *Sex Transm Dis.* 2016; 43(12): 756-60.
- Tang JW, Lin M, Chiu L, Koay ES. Viral loads of herpes simplex virus in clinical samples - A 5-year retrospective analysis. *J Med Virol.* 2010; 82(11): 1911-6.
- Tourinho R, de Almeida C, Lemos A, Gardinali NR, Vieira YR, Schmidt-Chanasit J, et al. Application of synthetic standard curves for absolute quantification of hepatitis A and E by real-time PCR. *J Genet Genome Res.* 2015; 2: 013.
- Weidmann M, Armbruster K, Hufert FT. Challenges in designing a Taqman-based multiplex assay for the simultaneous detection of herpes simplex virus types 1 and 2 and Varicella-zoster virus. *J Clin Virol.* 2008; 42(4): 326-34.

1 **Artigo 2 - (Em preparação)**

2

3 **HUMAN HERPESVIRUS 2 AMONG FEMALE SEX WORKERS FROM**
4 **CENTRAL BRAZIL: SEROPREVALENCE, RISK FACTORS AND VIREMIA**
5 **DETECTION**

6 L.R. Lima¹, N.A Araújo¹, A.S Silva¹, V. Mello¹; A.S.Perse¹, M.A, Horta², G.J.
7 Mousquer⁴³, F.R Pires³, M.A. Puga³; G.R.Rezende³; T.S.C.O.Tanaka³, L.S.
8 Castro³ A.R.C Motta-Castro³⁴; V.S. de Paula¹*

9 ¹Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro-RJ, Brazil

10 ²Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro-RJ, Brazil

11 ³Laboratório de Imunologia Clínica, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo
12 Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

13 ⁴Laboratório de Virologia Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, Campo Grande, Mato Grosso do
14 Sul, Brazil

15 *Address for correspondence: PhD. Vanessa Salete de Paula, Oswaldo Cruz
16 Foundation, IOC – Av. Brasil 4365-Manguinhos, Pav. Helio e Peggy Pereira
17 B219, 21040-360. Rio de Janeiro, Brazil. Tel (+55 21) 2562-1876

18 e-mail: vdepaula@ioc.fiocruz.br (VSP)

19

20 **Financial support:** Faperj/ PPSUS E-26/110.311/2014

21

22

ABSTRACT

23 Human herpesvirus 2 (HHV-2) is mainly transmitted during unsafe sexual
24 practices. Female sex workers (FSW) stand out as a vulnerable group for the
25 infection and transmission of sexual transmitted infections (STI). Therefore, this
26 study aims to investigate the seroprevalence and risk factors associated with
27 HHV-2, and to detect the HHV-2 DNA in blood samples from infected FSW. A
28 total of 376 FSW from Mato Grosso do Sul, Brazil, answered an epidemiological
29 questionnaire and provided blood samples. Serum samples were tested for HHV-
30 2 IgG and IgM using commercial enzyme-linked immunosorbent assays and
31 HHV-2 DNA was analyzed by Real Time PCR. The seropositivity for HHV-2 IgG
32 was 47.3 % (178/376) and for HHV-2 IgM was 10.1% (38/376). HHV-2 viremia
33 was detected in two infected-FSW with primary infection. Univariate and
34 multivariate analyses showed that the chance of HHV-2 infection was increased
35 with age and number of sexual partners. On the other hand, daily consuming of
36 alcohol and condoms use in the last intercourse were protection factors for HHV-
37 2 infection. The results demonstrated the high prevalence, risk behaviors and
38 primary infection among FSW from Mato Grosso do Sul. These results reinforce
39 the need to implement control and measures for prevention for HHV-2 infection
40 in this population.

41

42

43

44 INTRODUCTION

45 Human herpesvirus 2 (HHV-2) is the main cause of genital herpes in the
46 world. It is estimated that 417 million people worldwide are currently living with
47 the infection and that up to 267 million of women were living with HHV-2 in 2012
48 (1). In Brazil, the prevalence of HHV-2 among the general population is 11.3%
49 (2).

50 HHV-2 is mainly transmitted through sexual contact and typically develops
51 as an asymptomatic infection. Once the HHV-2 infection has taken place, this virus
52 is carried by retrograde transport to the nuclei of sensory ganglions, where it
53 establishes latent infections. HHV-2 reactivates when it is carried by anterograde
54 transport to the skin or mucosal surface that can lead to recurrent genital lesions
55 or asymptomatic viral shedding(2).

56 Many studies have pointed out various risk factors associated with HHV-
57 2, such as poor socioeconomic status, a high number of sexual partners, first
58 sexual intercourse at an early age, and a history of sexually transmitted infections
59 (STI) (3, 4).

60 Female sex workers (FSW) stand out as an important population for the
61 study of HIV/STI due to their high prevalence in this population (5, 6), and also
62 because they act as a bridge for the heterosexual transmission of HIV/STI from
63 high-risk groups to the general population (7). Despite the important role of
64 female sex workers in the dissemination of sexually transmitted infections, there
65 is a lack of studies and the prevalence of HHV-2 is unknown in FSW from Brazil

66 making it difficult to implement any measures for control and prevention.
67 Therefore, the current study aimed to evaluate the seroprevalence, detect of
68 HHV-2 DNA in serum samples and evaluate the risk factors associated with HHV-
69 2 serological diagnoses.

70 **MATERIAL AND METHODS**

71 **Ethics statement**

72 The Oswaldo Cruz Foundation Ethics Committee (number
73 895.159/CAEE:28183314.7.0000.5248) approved this study. All women provided
74 their written informed consent to participate in this study. All participants
75 answered a questionnaire with socio-demographic and risk factor questions (e.g.,
76 age, education level, condoms use in the last sexual intercourse, drug use,
77 genital lesion in the last year).

78 **Study design and recruitment**

79 This study is a cross-sectional study and the participants were recruited
80 between November 2010 and December 2011. The study was carried out with
81 female sex workers who prostitute themselves in public places like parks,
82 gardens, streets or gay parades and private places like saunas, nightclubs and
83 brothels in Campo Grande, Mato Grosso do Sul state, Brazil.

84 Only women who reported that they sold sex in exchange for money and/or
85 gifts and were more than 18 years old were included in this study. Transgender
86 sex workers and others FSW without mental and physical condition to answer the
87 questionnaire due to drug and alcohol adiction were excluded.

88 RDS method (Respondent-Driven Sampling) was used to recruit FSW.
89 RDS method begins with identifying and non-random recruiting of the first
90 participants, called seeds, who then select and recruit other participants for the
91 study (8). In this study four seeds were selected by convenience from a
92 population of interest. Each seed received three coupons to recruit three new
93 participants, after these three new participants recruited other three participants,
94 so the recruitment increases in “waves”.

95 In this study, all participants received the transportation costs as support.
96 All FSW were interviewed using a structured questionnaire and blood samples
97 were collected for HHV screening. In this study, all participants received the
98 transportation costs as support. All FSW were interviewed using a structured
99 questionnaire and blood samples were collected for HHV screening. In the
100 questionnaire had sociodemographic (“How old are you?”, “Where are you
101 from?”, “What is your skin color?”, “Do you support someone?”, “How many do
102 you earn per day?” “How many years did you study?”), sexual life and behavior
103 questions (How old were you in the first sexual intercourse?”, “How many sexual
104 partners did you have in the last week?” “How old were you in your first
105 commercial sex?” “Have you ever used drugs?”, “Have you ever used injectable
106 drugs?”, “How often do you consume alcohol?”).

107

108

109 **Serological tests**

110 Serum samples were analyzed for HHV-2 IgG and HHV-2 IgM using
111 commercial enzyme-linked immunosorbent assays (BIOELISA HSV-2 IgG,
112 Biokit® and RIDASCREEN HSV-2 IgM, AlkaTecnologia®). The results were
113 recorded as reagent or no-reagent according to the standard procedures
114 recommended by the manufacturer.

115 **HHV DNA detection and quantification**

116 Viral DNA was isolated from serum samples using commercial acid nucleic
117 extraction kit (High Pure Viral Nucleic Acid, Roche®). Reagent serum samples for
118 HHV-2 IgM were analyzed in duplicate in Taqman® real time PCR for HHV-2 DNA
119 detection, according to Lima et al., 2017 (9).

120 **Statistical analyses**

121 Aiming to test the association among variables, chi-square tests (X^2) were
122 used to verify those variables that had a relationship with the outcome variables
123 (serology + IgM and serology + IgG) in such a way they could be used in the
124 modeling process. Univariate logistic regression analyzes were performed
125 between serology results and those other variables that demonstrated
126 association with the outcome by chi-square analysis. Univariate regressions that
127 obtained significance less than 0.2 were selected to be included in the
128 multivariate modeling process. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals
129 (IC95%) were estimated using a logistic regression model between serology for
130 IgM and IgG, adjusting for age and smoking habit, being considered as potential
131 confounders. The stepwise method was used in the modeling process, with the
132 addition of variables that were included in the univariate models. Models were

133 tested to verify interaction between variables. After obtaining the final model, we
134 performed a residue analysis that showed a good fit for the model found. Data
135 analysis was performed using the statistical package R (version 3.1.1)

136

137 **RESULTS**

138 **Recruitment and characteristics of study population**

139 The samples size of 376 FSW was achieved in ten waves of recruitment.
140 91.5% of them were from the main city of Campo Grande, and 8.5% (32/376)
141 were from the small town of Ladário, but all of them worked as sex workers in
142 Campo Grande city. The mean of age was 30.8 (standard deviation [SD] 7.05)
143 and 35.1% were 21 to 25 years old. About 56.4% of FSW declared themselves
144 as brown. About the level education, 47.6% studied 5 to 9 years or until the
145 elementary school and 43.8% studied 10 to 12 years or until the high school
146 (Table 1). The majority of FSW (72.3%) reported they support someone and
147 58.8% declared that were earning \$55 to \$277 per day of work. Half of the FSW
148 (52.9%) were consuming alcohol every day, 41.8% used drugs and 1.3%
149 reported that they used injectable drugs. The blood transfusion was performing
150 by 14.6% of the FSW. Concerning sexual behavior, 49.2% of the FSW had their
151 first sexual intercourse between 13 to 15 years old and 40.2% reported that they
152 had the first commercial sex between 18 and 20 years. Half of the FSW (51.7%)
153 reported had less than seven sexual partners in the previous week. Sexual
154 practices more frequent among FSW were oral (46.3%) and vaginal (36.4%) sex.

155 The majority of FSW (97.1%) reported that they had used condoms in the last
156 sexual intercourse and 4.5% reported that they had genital lesions in the last
157 year.

158 **Seropositivity and HHV DNA detection**

159 Out of the 376 FSW, 178 (47.3%) were reagent for HHV-2 IgG and 38
160 (10.1%) were reagent for HHV-2 IgM. Of the reagents HHV-2 IgM samples,
161 36.8% (14/38) were only reagent for HHV-2 IgM and 63.2% (24/38) were
162 simultaneously positive for HHV-2 IgM and IgG. The HHV-2 DNA was detected
163 in two (2/38) reagent samples for only HHV-2 IgM, suggesting primary infection.

164 **Seropositivity for HHV-2 and associated risk behavior.**

165 Table 1 shows the association between seropositivity for HHV-2 IgG and
166 risk behavior. In the univariate analysis, the risk of HHV-2 infection increased with
167 age (26-30 years old (OR: 2.53 [1.24-5.16]); age 31-40 years old (OR: 5.73 [2.75-
168 11.92]); age > 41 years old (OR: 7.90 [2.49-25.0], respectively). Consuming of
169 alcohol every day (OR: 0.47 [0.24-0.92]) and use of condom in the last
170 intercourse OR: (0,10 [0,01-0,87]) showed decreased of risk of HHV-2 infection.
171 The risk of HHV-2 infection increased with high of number of sexual partners in
172 the previous week (11-15 sexual partners (OR: 2.30 [1.23-4.29]); 16-20 sexual
173 partners (OR: 3.25 [1.19-8.83] respectively).

174 In multivariate analysis were remained as risk factor for HHV-2 infection:
175 increased of age (26-30 years old (OR: 2.66 [1.23-5.75], age 31-40 years old

176 (OR: 5.03 (2.29-11.03), age > 41 years old (6.37 [1.85-21.94]) and 11-15 sexual
177 partners in the previous week.

178 **DISCUSSION**

179 In Brazil, there are some studies evaluating the sexual practices and
180 prevalence of HIV/STI in female sex workers (10-12) but until now, no specific
181 information about the human herpesvirus 2 infection in FSW has been reported.
182 This fact is disturbing because FSW are an important high-risk group linked to
183 the general population, so these studies about HHV-2 infection are need in Brazil
184 to know the prevalence and to perform any intervention. Although among FSW
185 the genital transmission of HHV-2 involves contact with vaginal secretions,
186 studies of detection of antibodies and DNA in serum samples are important to
187 know the prevalence and to detect viremia during primary infection by herpes
188 virus.

189 The prevalence of HHV-2 in this study was 47.3%, which is higher than
190 the prevalence found in the adult population in Brazil (~30%) (1) and is lower than
191 previous studies conducted with female sex workers from provinces in China
192 which showed prevalence ranging from 54.9% to 70.8% (7, 13). Studies with
193 FSW in Panama and Peru also exhibited higher prevalence (74.2% and 60.6%,
194 respectively) (14-16). However, the same prevalence found in Brazil was
195 reported in a study with female sex workers in Shanghai, China (47.3%) (5). The
196 diversity of prevalence found in this group around the world could be due to the
197 culture practices, behaviors and social conditions differences between these
198 countries.

199 This study showed a statistical association, in univariate and multivariate
200 analysis, between the prevalence of HHV-2 infection and the increase of age.
201 This association has already been demonstrated in different studies performed
202 with FSW in other countries (5, 13, 17). In general, the older FSW had a higher
203 time in a sex career and that contributes to a higher exposure to the risk of
204 infection. The use of condoms in the last sexual intercourse decreased 90% of
205 the risk of HHV-2 infection among FSW. Use of condoms between FSW and their
206 clients is common as showed in studies performed in Brazil and other countries,
207 which shows the awareness about safe sex as way to prevent the transmission
208 of IST (18, 19). Despite this, condoms use not was frequent during sexual lifelong
209 of the FSW due to high HHV-2 prevalence found in this study.

210 In agreement with our result, a previous study also showed that the
211 number of sexual partners is associated with the acquisition of HHV-2 in female
212 sex workers, and that a greater number of clients or sexual partners increased
213 the risk of HHV-2 (20). In this study, the alcohol consuming decreased 53% of
214 the chance of HHV-2 infection among FSW. Some studies showed high alcohol
215 consuming among FSW and the alcohol as risk behavior to IST acquisition (21,
216 22). The protective association between alcohol and HHV-2 infection among
217 FSW of this study could be better investigated.

218 FSW with primary infection (2/376) had HHV-2 DNA detected. The HHV
219 viremia in primary infection is considered rare because the virus normally follows the
220 neuronal route for its transport. HHV DNA has been detected in blood samples,
221 mainly in severe cases associated with neonates and immunocompromised

222 patients, but some patients with recurrent oral herpes and primary genital
223 infection also can show viremia (23-25).

224 Of the seventeen FSW who reported to have had genital lesions in the last
225 year, in nine was confirmed the HHV-2 infection. Although we can not confirm
226 that HHV-2 was the cause of these lesions, the diagnosis and monitoring of the
227 genital lesions is important because the genital herpes can facilitate the
228 acquisition of HIV (26).

229 This study has some limitations: the first was a high degree of similarity
230 found in our population because all participants were from only two cities of Mato
231 Grosso do Sul (Ladário and Campo Grande), it shown high preference for
232 recruiting participants of their own city. RDS method is not a simple random
233 sample, but subject to assumptions such as quantifying the size of participant
234 networks, which may be difficult to verify. Beside of its limitations, RDS has been
235 shown as an efficient probabilistic method of recruitment for FSW (27-29).

236 In conclusion, this study showed a high HHV-2 seroprevalence, risk factors
237 and two cases of primary infection with viremia detected among female sex
238 workers from Mato Grosso do Sul, Brazil. Once HHV-2 causes a latent infection
239 and it can be transmitted oral or sexually, pre-emptive efforts should be intensified
240 among female sex workers.

241

242

243 **REFERENCES**

- 244 1. Clemens SA, Farhat CK. Seroprevalence of herpes simplex 1-2 antibodies in
245 Brazil. *Rev Saude Publica*. 2010;44(4):726-34.
- 246 2. Smith G. Herpesvirus transport to the nervous system and back again. *Annu Rev*
247 *Microbiol*. 2012;66:153-76.
- 248 3. Corey L, Handsfield HH. Genital herpes and public health: addressing a global
249 problem. *JAMA*. 2000;283(6):791-4.
- 250 4. Beydoun HA, Dail J, Ugwu B, Boueiz A, Beydoun MA. Socio-demographic and
251 behavioral correlates of herpes simplex virus type 1 and 2 infections and co-infections
252 among adults in the USA. *Int J Infect Dis*. 2010;14 Suppl 3:e154-60.
- 253 5. Yang Y, Yao J, Gao M, Su H, Zhang T, He N. Herpes simplex virus type 2
254 infection among female sex workers in Shanghai, China. *AIDS Care*. 2011;23 Suppl
255 1:37-44.
- 256 6. Wang HB, Smith K, Brown KS, Wang GX, Chang DF, Xu JJ, et al. Prevalence,
257 incidence, and persistence of syphilis infection in female sex workers in a Chinese
258 province. *Epidemiol Infect*. 2011;139(9):1401-9.
- 259 7. Wang JJ, Zhu ZB, Yang X, Wu J, Wang HB, Feng L, et al. Herpes simplex virus
260 type 2 risks in female sex workers in the China-Vietnam border county of Hekou. *Biomed*
261 *Environ Sci*. 2012;25(6):706-10.
- 262 8. Amado LA, Villar LM, de Paula VS, Gaspar AM. Comparison between serum and
263 saliva for the detection of hepatitis A virus RNA. *J Virol Methods*. 2008;148(1-2):74-80.
- 264 9. Lima LR, Silva AP, Schmidt-Chanasit J, Paula VS. Diagnosis of human herpes
265 virus 1 and 2 (HHV-1 and HHV-2): use of a synthetic standard curve for absolute
266 quantification by real time polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017:0.
- 267 10. Fernandes FR, Mousquer GJ, Castro LS, Puga MA, Tanaka TS, Rezende GR, et
268 al. HIV seroprevalence and high-risk sexual behavior among female sex workers in
269 Central Brazil. *AIDS Care*. 2014;26(9):1095-9.
- 270 11. Schuelter-Trevisol F, Custódio G, Silva AC, Oliveira MB, Wolfart A, Trevisol DJ.
271 HIV, hepatitis B and C, and syphilis prevalence and coinfection among sex workers in
272 Southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(4):493-7.
- 273 12. Malta M, Monteiro S, Lima RM, Bauken S, Marco A, Zuim GC, et al. HIV/AIDS
274 risk among female sex workers who use crack in Southern Brazil. *Rev Saude Publica*.
275 2008;42(5):830-7.
- 276 13. Chen S, Yin Y, Chen X, Wang H, Yu Y, Wei W, et al. Seropositivity and risk factors
277 for herpes simplex virus type 2 infection among female sex workers in Guangxi, China.
278 *PLoS One*. 2013;8(7):e69697.

- 279 14. Hakre S, Arteaga G, Núñez AE, Bautista CT, Bolen A, Villarroel M, et al.
280 Prevalence of HIV and other sexually transmitted infections and factors associated with
281 syphilis among female sex workers in Panama. *Sex Transm Infect.* 2013;89(2):156-64.
- 282 15. Cárcamo CP, Campos PE, García PJ, Hughes JP, Garnett GP, Holmes KK, et
283 al. Prevalences of sexually transmitted infections in young adults and female sex workers
284 in Peru: a national population-based survey. *Lancet Infect Dis.* 2012;12(10):765-73.
- 285 16. Ramjee G, Williams B, Gouws E, Van Dyck E, De Deken B, Karim SA. The impact
286 of incident and prevalent herpes simplex virus-2 infection on the incidence of HIV-1
287 infection among commercial sex workers in South Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr.*
288 2005;39(3):333-9.
- 289 17. Wang H, Wang N, Chen RY, Sharp GB, Ma Y, Wang G, et al. Prevalence and
290 predictors of herpes simplex virus type 2 infection among female sex workers in Yunnan
291 Province, China. *Int J STD AIDS.* 2008;19(9):635-9.
- 292 18. Bruce E, Bauai L, Sapuri M, Kaldor JM, Fairley CK, Keogh LA. HIV knowledge,
293 risk perception, and safer sex practices among female sex workers in Port Moresby,
294 Papua New Guinea. *Int J Womens Health.* 2011;3:53-61.
- 295 19. Hladik W, Baughman AL, Serwadda D, Tappero JW, Kwezi R, Nakato ND, et al.
296 Burden and characteristics of HIV infection among female sex workers in Kampala,
297 Uganda - a respondent-driven sampling survey. *BMC Public Health.* 2017;17(1):565.
- 298 20. Chohan V, Baeten JM, Benki S, Graham SM, Lavreys L, Mandaliya K, et al. A
299 prospective study of risk factors for herpes simplex virus type 2 acquisition among high-
300 risk HIV-1 seronegative women in Kenya. *Sex Transm Infect.* 2009;85(7):489-92.
- 301 21. Chen NE, Strathdee SA, Uribe-Salas FJ, Patterson TL, Rangel MG, Rosen P, et
302 al. Correlates of STI symptoms among female sex workers with truck driver clients in two
303 Mexican border towns. *BMC Public Health.* 2012;12:1000.
- 304 22. Silverman JG, Raj A, Cheng DM, Decker MR, Coleman S, Bridden C, et al. Sex
305 trafficking and initiation-related violence, alcohol use, and HIV risk among HIV-infected
306 female sex workers in Mumbai, India. *J Infect Dis.* 2011;204 Suppl 5:S1229-34.
- 307 23. Berrington WR, Jerome KR, Cook L, Wald A, Corey L, Casper C. Clinical
308 correlates of herpes simplex virus viremia among hospitalized adults. *Clin Infect Dis.*
309 2009;49(9):1295-301.
- 310 24. Johnston C, Margaret A, Selke S, Remington M, Corey L, Wald A. Herpes simplex
311 virus viremia during primary genital infection. *J Infect Dis.* 2008;198(1):31-4.
- 312 25. James SH, Kimberlin DW. Neonatal herpes simplex virus infection: epidemiology
313 and treatment. *Clin Perinatol.* 2015;42(1):47-59, viii.
- 314 26. Suazo PA, Tognarelli EI, Kalergis AM, González PA. Herpes simplex virus 2
315 infection: molecular association with HIV and novel microbicides to prevent disease. *Med*
316 *Microbiol Immunol.* 2015;204(2):161-76.

317 27. Lyons C, Ketende S, Drame F, Grosso A, Diouf D, Ba I, et al. Physical and sexual
318 violence affecting female sex workers in Abidjan, Côte d'Ivoire: Prevalence, and the
319 relationship between violence, the work environment, HIV and access to health services.
320 J Acquir Immune Defic Syndr. 2017.

321 28. Moayedi-Nia S, Bayat Jozani Z, Esmaeeli Djavid G, Entekhabi F, Bayanolhagh
322 S, Saatian M, et al. HIV, HCV, HBV, HSV, and syphilis prevalence among female sex
323 workers in Tehran, Iran, by using respondent-driven sampling. AIDS Care.
324 2016;28(4):487-90.

325 29. Liu H, Dumenci L, Morisky DE, Xu Y, Li X, Jiang B. Syphilis among middle-aged
326 female sex workers in China: a three-site cross-sectional study. BMJ Open.
327 2016;6(5):e010420

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343 Table 1- Distribution of characteristic, prevalence (HHV-2 IgG) and Chi-square test (p-value) of the
344 female sex workers (n=376)

	HHV-2 IgG seropositivity		X ²
	N (%)	seropositivity (%)	
Skin color			0.32
White	119 (31.6)	62 (52.1)	
Black	39 (10.4)	16 (41)	
Brown	212 (56.4)	99 (46.7)	
Other	3 (0.8)	1 (33.8)	
Age			0.000
<20	59 (15.7)	17 (28.8)	
21-25	132 (35.1)	46 (34.8)	
26-30	81 (21.5)	41 (50.6)	
31-40	83 (22.1)	58 (69.9)	
>41	21 (5.6)	16 (76.2)	
Support someone			0.52
No	104 (27.7)	49 (47.1)	
Yes	272 (72.3)	129(47.4)	
Income per day			0.72
< \$55	138 (36.7)	64 (46.4)	
\$55 - \$277	221 (58.8)	105 (47.5)	
> \$277	12 (3.2)	7 (58.3)	
Alcohol consume			0.04
No	44 (11.7)	26 (59.1)	
Every day	199 (52.9)	81 (40.7)	
Once a week	116 (30.9)	61 (52.6)	
Once a month	17 (4.5)	10 (58.8)	
Drug use			0.03
No	219 (58.2)	113 (51.6)	
Yes	157 (41.8)	65 (41.4)	
Injectable drugs			0.55
No	371 (98.5)	176 (47.4)	
Yes	5 (1.3)	2 (40.0)	
Most frequent sexual practice			0.14
Oral	174 (46.3)	80 (46.0)	
Vaginal	137 (36.4)	60 (43.8)	
Anal	2 (0.5)	2 (100.0)	
All	63 (16.8)	36 (57.1)	
Condoms use in the last sexual intercourse			0.04
No	9 (2.4)	8 (88.9)	
Yes	365 (97.1)	169 (46.3)	
No remember	2 (0.5)	1 (50.0)	
Genital lesions in the last year			0.23
No	359 (95.5)	(46.8)	
Yes	17 (4.5)	(58.8)	
Education level (years)			0.66
0-4	18 (4.8)	11 (61.1)	
5-9	179 (47.6)	84 (46.9)	
10-12	164 (43.8)	75 (45.7)	
>13	14 (3.7)	7 (50.0)	
Age in first commercial sex			0.02
<15 years old	33 (8,8)	15 (45.5)	
18-20 years old	151 (40.2)	57 (37.7)	
21-25 years old	95 (25.3)	52 (54.7)	
26-30 years old	48 (12.8)	28 (58.3)	
>31 years old	17 (4.5)	10 (58.8)	
Age in first sexual intercourse			0.37
<12 years old	37 (9.8)	19 (51.4)	
13-15 years old	185 (49.2)	87 (47.0)	
16-18 years old	135 (35.9)	66 (48.9)	
>19 years old	18 (4.8)	5 (27.8)	

345	Number of sexual partners in the last week			0.008
	<7	194 (51.6)	81 (41.8)	
346	8-10	48 (12.8)	26 (54.2)	
	11-15	53 (14.1)	33 (62.3)	
	16-20	20 (5.3)	14 (70.0)	
	>20	57 (15.2)	22 (38,6)	

Table 2: Odds ratios (OR) and adjusted Odds ratios (OR_{AJ}) for univariate and multivariate models for HHV-2 IgG positivity of female sex workers (n = 376)

	HHV-2 IgG seropositivity	
	OR (IC95%)*	OR _{AJ} (IC95%)**
Alcohol consume		
No	1	
Every day	0.47 (0.24-0.92)	
Once a week	0.76 (0.38-1.55)	
Once a month	0.98 (0.31-3.08)	
Drug use		
No	1	
Yes	0.66 (0.43-1.00)	
Injectable drugs		
No	1	
Yes	0.73 (0.12-4.47)	
Support someone		
No	1	
Yes	1.01 (0.64-1.59)	
Most frequent sexual practice		
Oral	1	
Vaginal	0.63 (0.35-1.11)	
Anal	0.58 (0.32-1.06)	
All	12.5 (0.00-52.3)	
Condoms use in the last sexual intercourse		
No	1	
Yes	0.10 (0.01-0.87)	
No remember	0.12 (0.00-3.99)	
Age in first commercial sex		
<15 years old	1	
18-20 years old	0.72 (0.34-1.55)	
21-25 years old	1.45 (0.65-3.21)	
26-30 years old	1.68 (0.68-4.10)	
>31 years old	1.71 (0.52-5.60)	
Number of sexual partners in the last week		
<7	1	1
8-10	1.64 (0.87-3.11)	1.85 (0.93-3.67)
11-15	2.30 (1.23-4.29)	2.18 (1.11-4.27)
16-20	3.25 (1.19-8.83)	2.46 (0.85-7.12)
>20	0.87 (0.47-1.60)	0.69 (0.35-1.35)
Income per day		
< \$55	1	
\$55 - \$277	1.04 (0.68-2.57)	
> \$277	1.61 (0.48-5.34)	
Age		
<20	1	1
21-25	1.32 (0.67-2.57)	1.28 (0.62-2.64)
26-30	2.53 (1.24-5.16)	2.66 (1.23-5.75)
31-40	5.73 (2.75-11.92)	5.03 (2.29-11.03)
>41	7.90 (2.49-25.0)	6.37 (1.85-21.94)

* Odds Ratio (OR)

** Adjusted Odds Ratio (OR_{AJ})

Bold values are statistically significant at the p-value of 0.05



SHORT COMMUNICATION

Seroprevalence of Human Herpesvirus Type 2 in a Reference Center for Pregnant Women in Rio de Janeiro, Brazil

Lyana R.P. Lima¹; Guilherme Padalecki¹; Carlos A.V. Castro²; Jânio A. Cordeiro²; Vanessa S. de Paula¹

¹Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

²Departamento de Patologia Clínica, Instituto Instituto Nacional de Saúde da Mulher, Criança e do Adolescente, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

Introduction: Pregnant women stand as an relevant group for research about Human Herpesvirus (HHV-2) infection owing to the risk of mother-to-child transmission. **Methods:** Women attending in a prenatal care center were tested for HHV-2 IgM and IgG by ELISA. Quantitative PCR test was the chosen method to ascertain viremia. **Results:** The seroprevalence of IgG and IgM anti-HHV-2 was 20.6% and 2.2% respectively. HHV-2 viremia was found in one pregnant woman with HHV-2 IgM, leading to the assumption of primary infection. **Conclusion:** The significantly high prevalence of HHV-2 found and the ascertainment of primary infection in a pregnant woman underline the need for constant HHV-2 follow-up and diagnosis in order to avoid sexual transmission.

Key words: Seroprevalence, Pregnant Women, HSV-2

Genital herpes is a sexually transmitted infection (STI) caused by Human herpesvirus 1 and 2 (HHV-1 and HHV-2). HHV-2 is the main cause of genital herpes; and estimates are that 267 million women were infected in 2012 all over the world (Looker et al., 2015). During pregnancy, primary and recurrent genital infection of mother may pose a risk of virus transmission to neonates or fetus, leading to neonatal herpes. Neonatal herpes is a severe disease characterized by high morbidity and mortality, and associated with abortion, prematurity, growth restriction and severe neurological manifestations (Brown, 1997).

Neonatal transmission of HHV-2 is associated with the maternal infection in later pregnancy and no immune

response in seronegative pregnant women (Xi et al., 2006). In contrast, pregnant women seropositive to HHV-2 may undergo reactivation of latent infection and develop subsequent asymptomatic or symptomatic recurrent genital infection. Nearly 80% of women who gives birth to HHV-2-infected infants have unknown history of genital HHV-2 lesions (Whitley et al., 1998), and this leads to the need for following up the prevalence rate and diagnosing HHV-2 prenatal infection using serum or plasma samples to test not only symptomatic, but also asymptomatic pregnant women.

This study was approved by the Ethics Committee of Fundação Oswaldo Cruz (number 895.159). Seroprevalence of HHV-2 was tested in 136 pregnant women undergoing prenatal follow-up at Brazilian National Institute of Women, Children and Adolescents (IFF/ Fiocruz), in Rio de Janeiro, Brazil. Serological tests were performed to ascertain anti-HHV-2 IgG and IgM (BioKit® and AlkaTecnologia®) in serum or plasma samples. HHV-2 viremia was tested in all pregnant women by quantitative PCR (qPCR), with primer

*Corresponding author: Vanessa Saete de Paula
E-mail: vdepaula@ioc.fiocruz.br

sense 5'CGTCTCTGTAATGCTTCCT 3', antisense 5' TCTACCCACAACAGACCCACG 3' and probe VIC-CGCGGAGACATTGAGTACCAGATCG-MGB, in accordance with research conducted by Lima et al., 2017. Such qPCR revealed a detection limit of 10^3 copies/mL for HHV-2, and the standard curve applied for absolute quantification showed the following respective parameters: slope = -3.285, $R^2 = 0.998$. Data (age and gestational age) were evaluated under SPSS Program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), applying Pearson Chi-square Test with $P < 0.05$.

The average age of pregnant women was 28.8 years (\pm SD 7.34), given that 49.3% (67/136) of them were 30 years old. As for gestational age, 8.1% (11/136) were in the first trimester, 43.4% (59/136) were in the second trimester, and 48.5% (66/136) were in the third trimester of pregnancy. The seropositivity of anti-HHV-2 IgG and anti-HHV-2 IgM was 20.6% (28/136) and 2.2% (3/136), respectively. Among the patients with HHV-2 IgM (3/136), two of them were reagent only to IgM, and viremia was found in only one pregnant woman in the third trimester of pregnancy.

HHV-2 seroprevalence found (20.6%) was greater than that of anti-HHV-2 in pregnant women in Northeast India (8.7 %) (Biswas et al. 2011), which is compared to pregnant women from the Northwestern Region of Brazil (12.3%) (Miranda et al., 2014) and to the global prevalence of women (14.8%) (Looker et al., 2015). In this research, pregnant women under 30 years old showed 3.8 times less chance to be exposed to HHV-2 compared to those above 30 years old (ODDS: 3.8; IC: 1.5-9.7; $p=0.005$). It has already been proven and reported in previous scientific research that the increase of age, for herpes, stands a predictive factor for the increase of prevalence owing to the longest time of herpes exposure (ACOG Practice Bulletin., 2007).

REFERENCES

- Looker KJ, Margaret AS, Turner KM, Vickerman P, Gottlieb SL, Newman LM 2015. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections. *PLoS One* 10:e114989.
- Brown ZA, Selke S, Zeh J, Kopelman J, et al. The acquisition of herpes simplex virus during pregnancy. 1997. *N Engl J Med* 21:337(8):509-15.
- Xu F, Sternberg MR, Kottiri BJ, et al. Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States 2006. *JAMA* 296:964-973.
- Whitley RJ, Corey L, Arvin A, et al. Changing presentation of herpes simplex virus infection in neonates 1988. *J Infect Dis* 158:109-116.
- Lima LR, Silva AP, Schmidt-Chanast J, et al. Diagnosis of human herpes virus 1 and 2 (HHV-1 and HHV-2): use of a synthetic standard curve for absolute quantification by real time polymerase chain reaction. 2017. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 112(3):220-223.
- Biswas D, Borkakoty B, Mahanta J, et al. Seroprevalence and risk factors of herpes simplex virus type-2 infection among pregnant women in Northeast India. 2011. *BMC Infect Dis* 11:325.
- Miranda CA, Lima EG, de Lima DB, et al. Genital infection with herpes simplex virus types 1 and 2 in women from natal, Brazil 2014. *ISRN Obstet Gynecol* 2014;323657.
- ACOG Practice Bulletin. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. Management of herpes in pregnancy 2007. *Obstet Gynecol* 109:1489-98
- Johnston C, Margaret A, Selke S, Remington M, Corey L, Wald A 2008. Herpes simplex virus viremia during primary genital infection. *J Infect Dis* 198:31-34
- Juhl D, Mosel C, Nawroth F, et al. Detection of herpes simplex virus DNA in plasma of patients with primary but not with recurrent infection: Implications for transfusion medicine? 2010. *Transfus Med* 20:38-47.
- Harris JB, Holmes AP. Neonatal Herpes Simplex Viral Infections and Acyclovir: An Update. 2017. *J Pediatr Pharmacol Ther* 22(2):88-93

In this research, three pregnant women were tested positive for HHV-2 IgM in serum or plasma. Pregnant woman number 1 was positive for anti-HHV-2 IgG and IgM; while pregnant women numbers 2 and 3 were tested positive for IgM only. Furthermore, this study only considered asymptomatic women, whereas genital lesions were not covered by the scope of tests. Therefore, it may be concluded that positive results for IgM may be independently connected to infection, similarly to the connection between false positive results or cross reactions and another type of herpesvirus.

In turn, pregnant woman number 3 was found positive for viremia, showing HHV-2 with viral load of 2.3×10^3 copies/mL. This finding stresses the capital relevance of the diagnosis of maternal primary infection.

The ascertainment of HHV-DNA in blood is not so common, but previous research revealed that HHV-2 may be ascertainable in primary genital herpes (Johnston et al., 2008; Juhl, et al 2010). HHV viremia during pregnancy may lead to congenital transmission, given that this virus is able to reach the placenta. On account of this, not only genital lesions should be identified, but also the HHV viremia itself. Congenital transmission of HHV-2 may be treated and hindered by administering Acyclovir to infected pregnant women, as well as deciding for C-section when lesions or genital shedding had been found (Harris and Holmes, 2017).

This research showed significantly high seropositivity for HHV-2 and primary infection in pregnant women assisted in the abovementioned reference center, which underscores the need for ensuring investments in pre-emptive and awareness-raising measures during pregnancy in order to avoid sexual and mother-to-child transmission.

Co-infection of human herpesvirus type 2 (HHV-2) and human immunodeficiency virus (HIV) among pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil

Lyana Rodrigues Pinto Lima^a, Luis Eduardo Barros Costa Fernandes^b, Daniel A. M. Villela^c, Mariza Gonçalves Morgado^d, José Henrique Pilotto^{b,d} and Vanessa Salete de Paula^a

^aLaboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro - RJ, Brasil; ^bHospital Geral de Nova Iguaçu - HGNI, Rio de Janeiro-RJ, Brasil; ^cPrograma de Computação Científica, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, Brasil; ^dLaboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Pav. Leônidas Deane, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro- RJ, Brasil

ABSTRACT

Pregnant women who are infected with the Human Immunodeficiency Virus (HIV) are particularly vulnerable to severe and recurrent infections with Human Herpesvirus 2 (HHV-2). Neonatal transmission of HHV-2 has been associated with malformations and neurological sequelae in infants, which makes it very important to perform antenatal monitoring for genital herpes. In the study, 134 pregnant women infected with HIV were tested for HHV-2 IgM and IgG using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and had HHV-2 DNA analyzed by Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR). Fisher's exact test was applied to analyze the epidemiological dates ($p < 0.05$). A total of 59.7% of the pregnant women infected with HIV had HHV-2 IgG and 3.75% of them showed HHV-2 viremia. HHV-2 IgM was found in 6% of the pregnant women and 25% of them had HHV-2 viremia. The risk factors associated with HHV-2 seropositive were age under 20 and a CD4/CD8 ratio > 1 . Our study found high HHV-2/HIV coinfection prevalence and HHV-2 viremia among patients with recurrent and primary genital infection, reinforcing the need of prevention and control of HHV-2 infection in order to avoid this virus transmission.

ARTICLE HISTORY

Received 12 January 2017
Accepted 22 August 2017

KEYWORDS

Coinfection; pregnant women; HIV; HHV-2; HSV-2

Introduction

Genital herpes is a disease mainly caused by human herpesvirus 2 (HHV-2) and one of the most prevalent sexually transmitted infections (STIs) among women in reproductive age and it is found in 60%–90% of HIV-infected persons (WHO, 2016). Studies performed worldwide showed that HHV-2 prevalence range from 8.7% to 71.2% in pregnant women (Biswas et al., 2011; Miranda et al., 2014; Patterson et al., 2011). However, less common HHV-2 infections can be transmitted from pregnant women to their infants and cause significant sequelae in infants, such as spontaneous abortion, growth retardation, prematurity, and neonatal herpes (Brown et al., 1997).

Neonatal herpes is acquired during the congenital (5%), *peripartum* (85%), or *postpartum* (10%) period. Genital viral shedding is the most important risk factor involved in HHV-2 neonatal transmission. Pregnant women who have recently acquired genital herpes have a greater risk of transmitting HHV-2 to infants than women with established HHV-2 infection (Corey & Wald, 2009).

HHV viremia has been previously described in several clinical settings, including neonatal and disseminated infections (Berrington et al., 2009). In contrast, HHV viremia was reported during primary genital infections without gravidity (Johnston et al., 2008; Juhl et al., 2010).

It is estimated that 17.4 million women have HIV infection worldwide (WHO, 2016). In HIV-infected pregnant women, co-infection with STIs can increase the risk of vertical transmission of HIV and other pathogens (Taha & Gray, 2000). This risk is particularly pronounced if HIV infection is acquired during pregnancy (Aboud et al., 2008). The presence of HIV significantly increases the probability of acquiring HHV-2, and HHV-2 reactivation is more frequent in HIV-infected patients (Mayaud et al., 2009). Pregnant women with HIV/HHV-2 co-infection shed more frequently the HHV at delivery than the HIV-negative (Patterson et al., 2011).

In Brazil, several studies have estimated the prevalence of STIs in pregnant women but data regarding co-infection with HHV-2 in this population is scarce. Therefore, this study aims to evaluate the prevalence

and risk factors of HHV-2/HIV co-infection in pregnant women and to investigate the HHV-2 viremia among this population.

Methods

Ethics statement

The Oswaldo Cruz Foundation Ethics Committee (number 895.159/CAEE:28183314.7.0000.5248) approved this study. All women participating in this study signed an informed consent.

Study population

This study is retrospective and between April/2005 and August/2008, 134 women with confirmed HIV infection and pregnancy, aged 16 years or older, recruited at the HIV/STIs Outpatient Clinic in Hospital Geral de Nova Iguaçu (Rio de Janeiro) were included in this study. All participants had a clinical evaluation and answered a questionnaire with socio-demographic. Clinical and laboratory information were obtained from the medical records.

Serologic test

Serum or plasma samples collected were analyzed by commercial ELISA test for HHV-2 IgG and HHV-2 IgM (BIOELISA HHV-2 IgG, Biokit* and RIDASCREEN HHV-2 IgM, AlkaTecnologia*). The results were recorded as positive or negative according to the standard procedures recommended by the manufacturer.

HHV-2 DNA detection and quantification

Viral DNA was analyzed in duplicate by Real time PCR described by Lima, Perse, Schmidt-Chanasit, & De Paula, 2017. Positive samples for HHV-2 DNA were reanalyzed in triplicate and then submitted to genome amplification and sequencing to confirm the viral diagnosis using primers previously described for UL-27 (gB) (Burrel et al., 2013). Sequences obtained were compared with other deposited in Genbank, using the BLAST. The gene bank access numbers of the two strains are KY007703 and KY007705.

Statistical analysis

Two-sided Fisher's exact test was applied to serologic results and both demographic (ethnicity, average income etc.) and clinical (positive test for STIs, drugs etc.) variables. *P* values below 0.05 were considered of statistical significance.

Results

Characteristics of study population and screening for HHV-2

All socio-demographic and clinical information was described in the Table 1. Out of 134, 59.7% (80/134) were reagent for HHV-2 IgG, while 6% (8/134) had HHV-2 IgM. HHV-2 DNA was detected in 25% (2/8) of the patients with reagent HHV-2 IgM and in 3.75% (3/80) of the reagent for HHV-2 IgG. Although HHV-2 viremia has been detected in five pregnant women, only three of them had signs of genital herpes at the clinical examination (Table 2).

Sequencing of HHV-2 strains from HIV-infected pregnant women

Among the five samples with detectable HHV-2 viremia levels, two were sequencing to confirm the HHV-2 diagnosis. The strains were obtained from one patient with recurrent genital herpes and one patient with symptomatic primary infection. In the BLAST, the strains from HIV-infected pregnant women showed 98.8% of the identity with strains previously characterized. The identity between two strains from HIV-infected patients was 99.8%.

Risk factors associated to HHV-2/HIV co-infection

Table 1 shows that the HHV-2/HIV coinfection among pregnant women was statistically associated with patients under 20 years old (ODDs = 0.1 (0.0–0.6; *p* = 0.001) and CD4/CD8 ratio greater than 1 (ODDS: 0.2 (0.0–0.7); *p* = 0.05.)

Discussion

The lack of previous studies regarding HHV-2 infection in HIV-infected pregnant women in Brazil made it difficult for the medical community to evaluate the real impact of this co-infection in maternal-infant health and to implement effective treatment and monitoring programs for this disease. In our study, 134 pregnant women were evaluated for the presence of HHV-2/HIV co-infection. A high proportion of our cohort (59.7%) had already been exposed to HHV-2, and could therefore undergo reactivation of their latent infection during pregnancy, since the virus has the ability to establish lifelong latency in sensory neural ganglia following primary infection or lytic cycle activation (Whitley, 2004).

Worldwide, HHV-2 prevalence in HIV-infected pregnant women differs significantly, with studies showing

Table 1. Demographic characteristics and risk factors associated with HHV-2/HIV co-infection among pregnant women.

Variable	IgG					IgM			
	N. participants (%)	N. positives (%) Total = 80	Proportion CI (%)	Oddsratio	p. value	N. positives (%) Total = 8	Proportion CI (%)	Oddsratio	p. value
<i>Ethnic group</i>									
White	39 (29)	22 (56.4)	40.8–72.0	0.8 (0.4–1.9)	0.699	3 (7.7)	0.0–16.1	1.5 (0.2–8.2)	0.691
Black	44 (33)	26 (59.1)	44.6–73.6	1.0 (0.4–2.2)	1	2 (4.5)	0.0–10.7	0.7 (0.1–3.9)	1
Brown	50 (37)	32 (64.0)	50.7–77.3	1.3 (0.6–2.9)	0.471	3 (6.0)	0.0–12.6	1.0 (0.1–5.5)	1
Indigenous	1 (1)	0 (0.0)	0.0–0.0	0.0 (0.0–26.3)	0.403	0 (0.0)	0.0–0.0	0.0 (0.0–608.4)	1
<i>Marital Status</i>									
Married	103 (76.9)	60 (58.2)	48.7–67.8	0.8 (0.3–1.9)	0.667	6 (5.8)	1.3–10.3	0.9 (0.1–9.6)	1
Not married	31 (23.1)	20 (64.5)	47.7–81.4	1.3 (0.5–3.3)	0.677	2 (6.5)	0.0–0.2	1.1 (0.1–6.7)	1
<i>School degree</i>									
Elementary	93 (69)	56 (60.2)	50.3–70.2	1.1 (0.5–2.4)	0.851	3 (3.2)	0.0–6.8	0.2 (0.0–1.3)	0.057
High school	40 (30)	23 (57.5)	42.2–72.8	0.9 (0.4–2.0)	0.848	5 (12.5)	2.3–22.7	4.3 (0.8–29.0)	0.051
University	1 (1)	1 (100.0)	100.0–100.0	N/A	1	0 (0.0)	0.0–0.0	0.0 (0.0–608.4)	1
<i>Family income</i>									
<200	118 (88)	72 (61.0)	52.2–69.8	1.6 (0.5–5.1)	0.426	6 (5.1)	1.1–9.0	0.4 (0.1–4.2)	0.244
≥200 < 400	12 (9)	5 (41.7)	13.8–69.6	0.5 (0.1–1.8)	0.223	1 (8.3)	0.0–24.0	1.5 (0.0–13.5)	0.538
≥400	4 (3)	3 (75.0)	32.6–117.4	2.1 (0.2–110.4)	0.648	1 (25.0)	0.0–67.4	5.7 (0.1–82.8)	0.221
<i>STI before the current pregnancy</i>									
Yes	107 (79.9)	63 (58.9)	49.6–68.2	0.9 (0.3–2.3)	1	6 (5.6)	0.0–0.1	1.5 (0.2–71.0)	1
No	26 (19)	16 (61.5)	42.8–80.2	1.1 (0.4–3.0)	1	1 (3.8)	0.0–11.2	0.7 (0.0–6.0)	1
<i>Gestational age</i>									
1o trimester	42 (31)	21 (50.0)	34.9–65.1	0.5 (0.2–1.2)	0.126	5 (11.9)	2.1–21.7	5.3 (0.8–58.3)	0.044
2o trimester	54 (40)	37 (68.5)	56.1–80.9	1.9 (0.9–4.4)	0.097	1 (1.9)	0.0–5.4	0.2 (0.0–1.8)	0.136
3o trimester	28 (21)	16 (57.1)	38.8–75.5	0.9 (0.3–2.3)	0.828	1 (3.6)	0.0–10.4	0.6 (0.0–4.9)	1
<i>HIV diagnostic in current pregnancy</i>									
Yes	51 (38.1)	33 (64.7)	51.6–77.8	1.4 (0.7–3.2)	0.367	1 (2.0)	0.0–0.1	0.3 (0.0–2.2)	0.25
No	82 (61)	46 (56.1)	45.4–66.8	0.7 (0.3–1.5)	0.367	6 (7.3)	1.7–13.0	3.9 (0.5–185.0)	0.25
<i>VDRL test</i>									
Positive	13 (9.7)	7 (53.8)	26.7–80.9	0.8 (0.2–3.0)	0.768	1 (7.7)	0.0–0.2	1.4 (0.0–12.1)	0.568
Negative	121 (90.3)	73 (60.3)	51.6–69.0	51.6–69.0	0.768	7 (5.8)	1.6–9.9	0.7 (0.1–35.9)	0.568
<i>Hepatitis B</i>									
Positive	21 (15.7)	13 (61.9)	41.1–82.7	1.1 (0.4–3.4)	1	0 (0.0)	0.0–0.0	0.0 (0.0–3.2)	0.356
Negative	113 (84.3)	67 (59.3)	50.2–68.4	0.9 (0.3–2.6)	0.9	8 (7.0)	2.4–11.8	N/A	0.356
<i>Vaccine HBV</i>									
Positive	50 (37.3)	27 (54.0)	40.2–67.8	0.7 (0.3–1.5)	0.363	4 (8.0)	0.0–0.2	1.7 (0.3–9.8)	0.471
Negative	84 (62.7)	53 (63.1)	52.8–73.4	1.5 (0.7–3.1)	0.363	4 (4.8)	0.2–9.3	0.6 (0.1–3.3)	0.471
<i>Hepatitis C</i>									
Positive	1 (0.7)	1 (100.0)	100.0–100.0	N/A	1	0 (0.0)	0.0–0.0	0.0 (0.0–608.4)	1
Negative	33 (99.3)	79 (59.4)	51.1–67.7	0.0 (0.0–57.7)	1	8 (6.0)	2.0–10.1	N/A	1
<i>Genital herpes symptoms</i>									
Positive	3 (2.9)	1 (33.3)	35.2	1.3 (0.3–17.0)	1	2 (66.6)	42.3–81.4	1.2 (0.3–4.9)	1
Negative	102 (79.1)	63 (60.6)	51.2–70.0	N/A	0.4	4 (5.7)	1.3–10.3	N/A	1
<i>Delivery</i>									
elective c-section	76 (57)	48 (63.2)	52.3–74.0	1.5 (0.7–3.2)	0.36	4 (5.3)	0.2–10.3	0.7 (0.1–3.8)	0.714
emergency c-section	9 (7)	4 (44.4)	12.0–76.9	0.5 (0.1–2.6)	0.484	0 (0.0)	0.0–0.0	0.0 (0.0–8.6)	1
Vaginal	43 (32)	24 (55.8)	41.0–70.7	0.8 (0.4–1.8)	0.573	4 (9.3)	0.6–18.0	2.1 (0.4–11.7)	0.441
<i>CD4</i>									
CD4 < 200	7 (7.4)	5 (71.4)	38.0–104.9	1.7 (0.3–19.0)	0.698	0 (0.0)	0.0–0.0	0.0 (0.0–10.0)	1
CD4 > 200	88 (92.6)	52 (59.0)	48.8–69.4	0.6 (0.1–3.8)	0.698	7 (8.0)	0.0–0.1	N/A	1
<i>CD4/CD8</i>									
CD4/CD8 > 1,0	13 (13.7)	3 (23.1)	0.2–46.0	0.2 (0.0–0.7)	0.005	3 (23.1)	0.2–46.0	5.7 (0.7–39.3)	0.051
CD4/CD8 < 1,0	82 (86.3)	54 (65.8)	55.6–76.6	6.3 (1.5–38.4)	0.005	4 (4.8)	0.2–9.5	0.2 (0.0–1.4)	0.051
<i>Age</i>									
<20	15 (11)	3 (20.0)	0.0–40.2	0.1 (0.0–0.6)	0.001	1 (6.7)	0.0–19.3	1.1 (0.0–10.0)	1
>20 < 30	87 (65)	56 (64.4)	54.3–74.4	1.7 (0.8–3.8)	0.144	5 (5.7)	0.9–10.6	0.9 (0.2–6.0)	1
>30 < 40	27 (20)	18 (66.7)	48.9–84.4	1.4 (0.6–4.0)	0.512	1 (3.7)	0.0–10.8	6 (0.0–4.6)	1
>40	5 (4)	3 (60.0)	17.1–102.9	1.0 (0.1–12.5)	1	1 (20.0)	0.0–55.1	4.3 (0.1–51.9)	0.268

Note: N participants, number of participants; N. positives, number of positives; STI, sexually transmitted infection; CI, confidence interval; HBV, hepatitis B virus.

prevalence ranging from 28.7% in Washington to as high as 86% in Uganda (Nakubulwa, Mirembe, Kaye, & Kaddu-Mulindwa, 2009; Patterson et al., 2011), the prevalence is nevertheless higher than in HIV-negative pregnant women. This may be explained by the synergism between HIV and HHV-2, the genital infections

caused by HHV-2 increases the probability of acquiring HIV through the appearance of microlesions caused by HHV-2, which exposes immune cells in the epidermis and dermis to HIV (Duluc et al., 2013). On the other hand, HHV-2 infection is associated with cellular immune response depletion, as occurs with HIV-infected

Table 2. Clinical and serological diagnosis of the five pregnant women with HHV-2 viremia.

Patient	HHV-2 IgM	HHV-2 IgG	Viral load (copies/ml)	Genital herpes
1	+	-	$5,4 \times 10^4$	+
2	+	-	$8,7 \times 10^3$	+
3	-	+	$1,6 \times 10^2$	-
4	-	+	$3,3 \times 10^2$	-
5	-	+	$7,9 \times 10^2$	+

Note: +, positive; -, negative.

patients thus, reactivation of HHV-2 is more frequent in HIV-infected patients (Mayaud et al., 2009).

In this study, HHV-2 viremia was found in five patients, three of them had past HHV-2 infection (HHV-2 IgG) and two had likely primary infection (HHV-2 IgM). Only one (1/3) patient with HHV-2 viremia and past infection showed genital herpes in clinical examination, suggesting a recurrent genital herpes. In agreement with our result, two other studies showed HHV DNA detected in PBMCs and whole blood of patients with recurrent herpes during the active infection (Bezold et al., 2000; Brice et al., 1992).

Two pregnant women with past HHV-2 infection, who presented HHV-2 viremia, were asymptomatic for genital or oral herpes at the clinical examination. In agreement with this result, Perse da Silva et al. (2015) showed HHV-1 viremia among 38.3% HIV-positive patients without symptoms for herpes, suggesting the possibility of this event occur in immunocompromised patients. Maternal genital shedding was not investigated in these patients. However, HHV-2 was found in two maternal blood samples during her asymptomatic and recurrent infection, thereby, the possibility of hemotogenous transplacental transmission of HHV-2 should be considered and better studied.

HHV-2 IgM was detected in 6% (8/134) of the HIV-infected pregnant women. Only two of them (2/8) showed HHV-2 viremia and symptoms of genital herpes at the clinical examination, which reinforces the hypothesis of primary HHV-2 infection. Symptomatic primary infection translates into a higher risk for neonatal HHV-2 acquisition, since vertical transmission is significantly common during maternal primary infection when compared to recurrent genital infections (Brown et al., 2003).

Among those who had already been exposed to HHV-2, CD4/CD8 ratio >1 and age under 20 years old were protecting factors for HHV-2/HIV co-infection. HHV-2 reagent testing increases with age due to a longer sexual exposure, and a higher CD4/CD8 ratio in HIV-infected patients demonstrate improvements in cellular immune response, causing a decrease in the occurrence of opportunistic infections.

Meaningful number of pregnant women (38.1%) was diagnosed with HIV infection during the current pregnancy. This data emphasizes the need for more investments in HIV screening programs and access to care for childbearing women in order to reduce HIV vertical transmission as well as of HHV-2.

Our findings show a high prevalence of HHV-2/HIV co-infection, protecting factors and viremia during symptomatic primary and recurrent HHV-2 infections among pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil. Antenatal HHV-2 testing should be considered an important tool for the diagnosis, treatment, and prevention of further transmission of HHV-2 and HIV. In this context, not only this population could benefit from that, but also their sexual partners and newborns, who could be protected from adverse outcomes including congenital or perinatal infection.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work did not receive any specific grant from funding agencies in public, commercial, or non-profit sectors.

References

- Aboud, S., Msamanga, G., Read, J. S., Mwatha, A., Chen, Y. Q., Potter, D., ... Fawzi, W. W. (2008). Genital tract infections among HIV-infected pregnant women in Malawi, Tanzania and Zambia. *International Journal of STD & AIDS*, 19, 824–832. doi:10.1186/1525-2875-19-824
- Berrington, W. R., Jerome, K. R., Cook, L., Wald, A., Corey, L., & Casper, C. (2009). Clinical correlates of herpes simplex virus viremia among hospitalized adults. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 1295–1301. doi:10.1086/606053
- Bezold, G., Gottlöber, P., Leiter, U., Kerscher, M., Krähn, G., & Peter, R. U. (2000). Quantitation of herpes simplex DNA in blood during aciclovir therapy with competitive PCR ELISA. *Dermatology*, 201, 296–299. doi:10.1046/j.1529-0928.2000.00000.x
- Biswas, D., Borkakoty, B., Mahanta, J., Walia, K., Saikia, L., Akoijam, B. S., ... Zomawia, E. (2011). Seroprevalence and risk factors of herpes simplex virus type-2 infection among pregnant women in Northeast India. *BMC Infectious Diseases*, 11, S3. doi:10.1186/1471-2334-11-S3-25
- Brice, S. L., Stockert, S. S., Jester, J. D., Huff, J. C., Bunker, J. D., & Weston, W. L. (1992). Detection of herpes simplex virus DNA in the peripheral blood during acute recurrent herpes labialis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 26, 594–598. Retrieved from <https://www.journals.elsevier.com/journal-of-the-american-academy-of-dermatology/>. doi:10.1016/0190-9622(92)70087-V
- Brown, Z. A., Selke, S., Zeh, J., Kopelman, J., Maslow, A., Ashley, R. L., ... Corey, L. (1997). The acquisition of herpes simplex virus during pregnancy. *New England Journal of*

- Medicine*, 337, 509–516. doi:10.1056/NEJM199708213370801
- Brown, Z. A., Wald, A., Morrow, R. A., Selke, S., Zeh, J., & Corey, L. (2003). Effect of serologic status and cesarean delivery on transmission rates of herpes simplex virus from mother to infant. *JAMA*, 289, 203–209. Retrieved from <http://jamanetwork.com/journals/jama>. doi:10.1001/jama.289.2.203
- Burrell, S., Abrao, E. P., Désiré, N., Seang, S., Caumes, E., Agut, H., & Boutolleau, D. (2013). Detection of a new variant of herpes simplex virus type 2 among HIV-1-infected individuals. *Journal of Clinical Virology*, 57, 267–269. doi:10.1016/j.jcv.2013.03.008
- Corey, L., & Wald, A. (2009). Maternal and neonatal herpes simplex virus infections. *New England Journal of Medicine*, 361, 1376–1385. doi:10.1056/NEJMra0807633
- Duluc, D., Gannevat, J., Anguiano, E., Zurawski, S., Carley, M., Boreham, M., ... Oh, S. (2013). Functional diversity of human vaginal APC subsets in directing T-cell responses. *Mucosal Immunology*, 6, 626–638. doi:10.1038/mi.2012
- Johnston, C., Magaret, A., Selke, S., Remington, M., Corey, L., & Wald, A. (2008). Herpes simplex virus viremia during primary genital infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 198, 31–34. doi:10.1086/588676
- Juhl, D., Mosel, C., Nawroth, F., Funke, A. M., Dadgar, S. M., Hagenström, H., ... Hennig, H. (2010). Detection of herpes simplex virus DNA in plasma of patients with primary but not with recurrent infection: Implications for transfusion medicine? *Transfusion Medicine*, 20, 38–47. doi:10.1111/j.1365-3148.2009.00951
- Lima, L. R. P., Perse, A. S., Schmidt-Chanasit, J., & De Paula, V. S. (2017). Diagnosis of human herpes virus 1 and 2 (HHV-1 and HHV-2): use of a synthetic standard curve for absolute quantification by real time polymerase chain reaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(3), 220–223. doi:10.1590/0074-02760160354
- Mayaud, P., Legoff, J., Weiss, H. A., Grésengué, G., Nzambi, K., Bouhjal, H., ... Group, A. S. (2009). Impact of acyclovir on genital and plasma HIV-1 RNA, genital herpes simplex virus type 2 DNA, and ulcer healing among HIV-1-infected African women with herpes ulcers: A randomized placebo-controlled trial. *The Journal of Infectious Diseases*, 200, 216–226. doi:10.1086/599991
- Miranda, C. A., Lima, E. G., de Lima, D. B., Cobucci, R. N., Cornetta, M. a. C., Fernandes, T. A., ... Fernandes, J. V. (2014). Genital infection with herpes simplex virus types 1 and 2 in women from natal, Brazil. *ISRN Obstetrics and Gynecology*, 2014, 1–8. doi:10.1155/2014/323657
- Nakubulwa, S., Mirembe, F. M., Kaye, D. K., & Kaddu-Mulindwa, D. (2009). Association between HSV-2 and HIV serostatus in pregnant women of known HIV serostatus attending Mulago hospital antenatal clinic, Kampala, Uganda. *Journal Of Infection in Developing Countries*, 3, 803–806. Retrieved from <http://www.jidc.org/index.php/journal>
- Patterson, J., Hitti, J., Selke, S., Huang, M. L., Watts, D. H., Brown, Z., ... Wald, A. (2011). Genital HSV detection among HIV-1-infected pregnant women in labor. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2011, 1–4. doi:10.1155/2011/157680
- Perse da Silva, A., Lopes, A. e. O., Vieira, Y. R., de Almeida, A. J., Sion, F. S., Grinsztejn, B., ... de Paula, V. S. (2015). Genotypic characterization of herpes simplex virus type 1 isolates in immunocompromised patients in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*, 10, e0136825. doi:10.1371/journal.pone.0136825
- Taha, T. E., & Gray, R. H. (2000). Genital tract infections and perinatal transmission of HIV. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 918, 84–98. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb05477.x
- Whitley, R. (2004). Neonatal herpes simplex virus infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 17, 243–246. Retrieved from <http://journals.lww.com/co-infectiousdiseases/Pages/default.aspx> doi:10.1097/00001432-200406000-00012
- World Health Organization. (2016). *Herpes simplex virus*. Retrieved from <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs400/en/>

Artigo 5 (Submetido)

Manuscript Details

Manuscript number	VIRUS_2017_312
Title	Glycoprotein B gene sequencing of human herpesvirus2 strains from Brazilian HIV-1coinfected subjects suggests the existence of a new clade
Article type	Short Communication

Abstract

Human herpes virus 2 (HHV-2) is a DNA virus with a limited genetic variability. HHV-2 strains have been classified into two clades, A and B, based on divergence in the coding regions of envelope glycoproteins. In this study, the glycoprotein B (gB) coding regions (2,250 bp) of six HHV-2 strains derived from Brazilian women were PCR amplified and almost totally sequenced. By phylogenetic analysis, four HHV-2 strains were classified into clade B, while the remaining two, derived from HIV-1coinfected women, showed a notable genetic divergence (> 1%) when compared with all samples from around the world. Moreover, when compared with all the 140 HHV-2 gB sequences available in GenBank, 16 unique nucleotide substitutions were found in both strains derived from HIV positive women, suggesting that these strains belong to a new clade. Further studies, based on different regions of the HHV-2 genome, are needed to confirm the existence of the new clade and to investigate the impact of such new variants in the pathogenesis of HHV-2 infection and HIV/HHV-2 coinfection.

Keywords	Brazil, clade, coinfection, glycoprotein B,HHV-2, HIV
Corresponding Author	Vanessa de Paula
Order of Authors	Lyana Lima, Nathália Alves de Araújo, Alexandro Guterres, Amanda Perse, José Henrique Pilotto, Christian Niel, Vanessa de Paula
Suggested reviewers	Tatiana Xavier, Jonas Schmidt, Rafael Varella, David Boutolleau

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

cover letter virus research.docx [Cover Letter]

Highlights.docx [Highlights]

Artigo 5 Lyana 26-05.docx [Manuscript File]

Slide1.TIF [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

1 **Glycoprotein B gene sequencing of human herpesvirus2 strains from**
2 **Brazilian HIV-1coinfected subjects suggests the existence of a new clade**

3
4 Lyana Rodrigues Pinto Lima^a, Nathália Alves de Araújo^a, Alexandro Guterres^b,
5 Amanda Perse¹, José Henrique Pilotto^{c,d}, Christian Niel^a, Vanessa Salete de
6 Paula^{a,*}

7
8 ^a*Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de*
9 *Janeiro, RJ, Brazil*

10 ^b*Laboratório de Hantavirose e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz,*
11 *Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

12 ^c*Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz,*
13 *Fiocruz, RJ, Brazil*

14 ^d*Hospital Geral, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

15

16

17

18

19 * Corresponding author at: Av. Brasil, 4365 – Pavilhão Helio e Peggy Pereira,
20 CEP: 21045-900, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

21 E-mail address: vdepaula@ioc.fiocruz.br (V.S. de Paula)

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

38 **Summary**

39 Human herpes virus 2 (HHV-2) is a DNA virus with a limited genetic variability. HHV-2
40 strains have been classified into two clades, A and B, based on divergence in the
41 coding regions of envelope glycoproteins. In this study, the glycoprotein B (gB) coding
42 regions (2,250 bp) of six HHV-2 strains derived from Brazilian women were PCR
43 amplified and almost totally sequenced. By phylogenetic analysis, four HHV-2 strains
44 were classified into clade B, while the remaining two, derived from HIV-1coinfected
45 women, showed a notable genetic divergence (> 1%) when compared with all samples
46 from around the world. Moreover, when compared with all the 140 HHV-2 gB
47 sequences available in GenBank, 16 unique nucleotide substitutions were found in
48 both strains derived from HIV positive women, suggesting that these strains belong to a
49 new clade. Further studies, based on different regions of the HHV-2 genome, are
50 needed to confirm the existence of the new clade and to investigate the impact of such
51 new variants in the pathogenesis of HHV-2 infection and HIV/HHV-2 coinfection.

52

53

54

55 **Keywords** – Brazil, clade, coinfection, glycoprotein B,HHV-2, HIV

56

57

58 **Funding:** This work was supported by FAPERJ, (PAPES IV 407430/2012-1 - APQ)

59

60

63 Human herpesvirus 2 (HHV-2) is the main cause of genital herpes. HHV-2
64 infects the genital epithelial mucosa and establishes reactivable latency in the lumbar-
65 sacral ganglia, which may cause recurrent infections(Smith, 2012).Worldwide, an
66 estimated 417 million people aged 15–49 years (prevalence, 11.3%) were living with
67 HHV-2 infection in 2012, and 267 million of them were women(Looker et al., 2015). A
68 previous study performed in Brazil has revealed an HHV-2 prevalence of 15.6% among
69 women(Caldeira et al., 2013). The virus is mainly transmitted through sexual contact
70 and typically causes an asymptomatic infection. Infected women can pass the virus on
71 to their sexual partners and to their babies through vertical transmission.

72 HHV-2 is an enveloped virus belonging to the *Herpesviridae* family. HHV-2
73 double-stranded DNA genome is approximately 155,000bplong.The envelope is a lipid
74 bilayer with 12 glycoproteins which are necessary for early interactions between virus
75 and target cells(Haarr and Skulstad, 1994). Little is known about the genetic diversity of
76 the HHV-2 strains circulating worldwide. The glycoprotein B (gB) coding sequence is
77 one of the most conserved genes within the family *Herpesviridae* (Norberg et al.,
78 2007). Phylogenetic analyses performed with genes coding for glycoproteins G, I, E
79 and B led to the classification of HHV-2 strains into two clades, A and B (Norberg et al.,
80 2007; Schmidt-Chanasit et al., 2010). However, no classification has yet been
81 established based on complete genome sequences (Newman et al., 2015). Strains
82 from Europe (Norberg et al., 2007; Schmidt-Chanasit et al., 2010), America (Koelle et
83 al., 2017; Newman et al., 2015), Asia (Newman et al., 2015) and Africa (Burrell et al.,
84 2015; Koelle et al., 2017; Newman et al., 2015; Norberg et al., 2007) have been
85 characterized. However, no data are available for HHV-2 strains circulating in Brazil.

86 Six HHV-2 infected women (two whites, three browns and one black), aged 26
87 to 58 years and living in Rio de Janeiro, Brazil were enrolled in this study. Two of them
88 (one brown and one black) were pregnant and coinfecting with HIV-1. Their CD4/CD8
89 ratios were 0.61 and 1.18, respectively, and they received antiviral therapy. This study

90 was approved by the Human Research Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Institute
91 (protocol number 895159) All six participants signed an informed consent form

92 Blood samples and cutaneous lesions were collected at the time of appearance
93 of the genital lesions. Antibodies against HHV-2 were detected by enzyme
94 immunoassay (Ridascreen HSV-2, IgG, IgM, R-Biopharm, Darmstadt, Germany). Viral
95 DNA was isolated by using the High Pure Viral Nucleic AcidKit (Roche, Mannheim,
96 Germany) according to the manufacturer's instructions. HHV-2 DNA was detected by
97 real time polymerase chain reaction (PCR), as previously described (Lima et al., 2017)
98 .In addition, ten overlapping genome segments, covering all the gB encoding region
99 (UL-27; 2,250bp)were amplified in single round PCR assays. Sequences and genome
100 positions of the oligonucleotide primers used in this study are shown on Table 1(Abrão
101 et al., 2015). Each reaction was performed in a 25-µL volume containing 5 µL of DNA,
102 0.3 µM of each primer, 1 unit of Go Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI), and
103 DNase/RNase-free distilled water under the followed conditions: 95°C for 5 min,40
104 cycles of 95°C for 30s, 55-59°C(temperature varied according to the primer pair) for
105 45s,72°C for 90 s, followed for10 min at 72°C. PCR products were purified using the
106 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and directly sequenced with the
107 ABI Big Dye Terminatorc ycle sequencing kit, version 1.1 (Applied Biosystems, Foster
108 City, CA) and the primers used for PCR.

109 Multiple sequence alignments were done with sequences from this study and all
110 the 140 HHV-2 gB sequences available in GenBank using MUSCLE, in the Mega 6.1
111 program. The best-fit evolutionary model was determined using the jModelTest version
112 2.0. Phylogenetic relationships among 37 HHV-2 strains were estimated by the
113 Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method, implemented in MrBayes,
114 version 3.2.3. The Bayesian analysis consisted of two simultaneous independent runs
115 of 5 million MCMC generations (burn-in of 25%).

116 All six samples gave positive results for HHV-2 IgG antibodies and real time PCR.
117 Viral load varied from 3.5×10^2 to 1.5×10^6 genome equivalents per microliter of

118 resuspended DNA. The gB coding sequences of all six HHV-2 strains were
119 determined. Phylogenetic analysis showed that the four HHV-2 Brazilian strains (BR14,
120 BR20, BR22 and BR41) derived from the HIV negative women showed a close genetic
121 relationship between them (99.4-99.6% of sequence identity) and clustered with
122 European, North American and Asian strains into clade B (Fig. 1). The two strains
123 derived from the HIV positive women (BR21 and BR123) were almost identical (99.8%
124 of sequence identity) but clustered separately from strains previously classified into
125 clades A (genetic divergence of 1.2-1.3%) and B (1.1-1.2%) with a posterior probability
126 of 1.

127 Furthermore, strains BR21 and BR123 showed 16 unique nucleotide substitutions
128 when compared with all 140 HHV-2 Gb sequences available in GenBank (Table 2).
129 Twelve of these mutations were G→C and C→G transversions. Interestingly, four of
130 these 16 mutations were also present in the chimpanzee alphaherpesvirus (ChHV)
131 prototype strain 105640. Of these 16 mutations, 14 were silent while the remaining two
132 (G1411C and G1747A) resulted in changes Ala to Pro and Val to Ile changes,
133 respectively (Table 2). Phylogenetic analysis demonstrated that strains BR21 and
134 BR123 did not cluster in either of the two clades already known, A and B, but in a new
135 one, tentatively named clade C.

136 HHV-2 genome, as well as the other herpesvirus genomes, is characterized by
137 a low rate of mutation occurrence during its replication process (Thiry et al., 2005).
138 Previous studies that analyzed gB glycoprotein sequences show low divergence (0.2-
139 0.5%) among HHV-2 strains reported worldwide, moreover it is the most closely
140 related glycoprotein between HHV-1 and HHV-2 (Lamers et al., 2015; Newman et al.,
141 2015). In the present study, the divergence rates found in the gB gene of BR21 and
142 BR123 were greater than 1%, and these divergence rates are twice as high as those
143 found in previous studies that investigated the diversity of HHV-2 using gB gene

144 (Lamers et al., 2015; Newman et al., 2015; Norberg et al., 2007), therefore we suggest
145 that BR21 and BR123 strains belongs to a new genetic clade, named clade C.

146 HHV-2 Brazilian strains classified into the new clade were derived from HIV-
147 infected pregnant and showed 16 unique mutations that could represent molecular
148 signature of relationshipwith HIV infection status. Burrel et al. 2013 also reported a new
149 HHV-2 among HIV-infected patients, showing high degree of genetic divergence of the
150 UL30 encoding the DNA polymerase (mean, 2.1%) and US4 encoding the glycoprotein
151 G (mean, 1.7%) (Burrel et al., 2013).

152 HHV-2 is more closely related to ChHV than to HHV-1 (Severini et al., 2013).
153 HHV-1 diverged from ChHV about 6 million years ago and HHV-2 diverged from ChHV
154 only 1.6 million years ago (Wertheim et al., 2014). In this study, Brazilian strains
155 classified into the new clades hared mutations with the ancestral ChHV, and the tree
156 topology suggest that these strains are ancient when compared the 37 sequence used
157 to phylogenic analysis.

158 The gB glycoprotein is essential for viral entry into host cells(Li et al., 2006)and
159 some sequences variations can be important for cell tropism and pathogenesis
160 (Terhune et al., 1998). In this context, it is important to investigate the relationship
161 between the gB from HHV-2 strains and its interaction with sulfate heparin and the
162 entry receptors.

163 Our study showed the first molecular characterization of HHV-2 strains from
164 Brazil and detected variants derived from HIV-infected patients that belong into the new
165 clade. Nevertheless, more epidemiological and molecular studies are required to
166 confirm the existence of the new clade and the specific role and impact of HHV-2
167 variants on the pathogenesis of HIV coinfection.

171 References

- 172 Abrão, E.P., Burrel, S., Désiré, N., Bonnafous, P., Godet, A., Caumes, E., Agut, H., Boutolleau,
173 D., 2015. Impact of HIV-1 infection on herpes simplex virus type 2 genetic variability
174 among co-infected individuals. *J Med Virol* 87(3), 357-365.
- 175 Burrel, S., Abrão, E.P., Désiré, N., Seang, S., Caumes, E., Agut, H., Boutolleau, D., 2013.
176 Detection of a new variant of herpes simplex virus type 2 among HIV-1-infected
177 individuals. *J Clin Virol* 57(3), 267-269.
- 178 Burrel, S., Désiré, N., Marlet, J., Dacheux, L., Seang, S., Caumes, E., Bourhy, H., Agut, H.,
179 Boutolleau, D., 2015. Genetic Diversity within Alphaherpesviruses: Characterization of a
180 Novel Variant of Herpes Simplex Virus 2. *J Virol* 89(24), 12273-12283.
- 181 Caldeira, T.D., Gonçalves, C.V., Oliveira, G.R., Fonseca, T.V., Gonçalves, R., Amaral, C.T.,
182 Hora, V.P., Martinez, A.M., 2013. Prevalence of herpes simplex virus type 2 and risk
183 factors associated with this infection in women in southern Brazil. *Rev Inst Med Trop*
184 *Sao Paulo* 55(5), 315-321.
- 185 Haarr, L., Skulstad, S., 1994. The herpes simplex virus type 1 particle: structure and molecular
186 functions. Review article. *APMIS* 102(5), 321-346.
- 187 Koelle, D.M., Norberg, P., Fitzgibbon, M.P., Russell, R.M., Greninger, A.L., Huang, M.L.,
188 Stensland, L., Jing, L., Magaret, A.S., Diem, K., Selke, S., Xie, H., Celum, C., Lingappa,
189 J.R., Jerome, K.R., Wald, A., Johnston, C., 2017. Worldwide circulation of HSV-
190 2 × HSV-1 recombinant strains. *Sci Rep* 7, 44084.
- 191 Lamers, S.L., Newman, R.M., Laeyendecker, O., Tobian, A.A., Colgrove, R.C., Ray, S.C.,
192 Koelle, D.M., Cohen, J., Knipe, D.M., Quinn, T.C., 2015. Global Diversity within and
193 between Human Herpesvirus 1 and 2 Glycoproteins. *J Virol* 89(16), 8206-8218.
- 194 Li, W., Minova-Foster, T.J., Norton, D.D., Muggeridge, M.I., 2006. Identification of functional
195 domains in herpes simplex virus 2 glycoprotein B. *J Virol* 80(8), 3792-3800.
- 196 Lima, L.R., Silva, A.P., Schmidt-Chanasit, J., Paula, V.S., 2017. Diagnosis of human herpes
197 virus 1 and 2 (HHV-1 and HHV-2): use of a synthetic standard curve for absolute
198 quantification by real time polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 112(3),
199 220-223.
- 200 Looker, K.J., Magaret, A.S., Turner, K.M., Vickerman, P., Gottlieb, S.L., Newman, L.M., 2015.
201 Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in
202 2012. *PLoS One* 10(1), e114989.
- 203 Newman, R.M., Lamers, S.L., Weiner, B., Ray, S.C., Colgrove, R.C., Diaz, F., Jing, L., Wang,
204 K., Saif, S., Young, S., Henn, M., Laeyendecker, O., Tobian, A.A., Cohen, J.I., Koelle,
205 D.M., Quinn, T.C., Knipe, D.M., 2015. Genome Sequencing and Analysis of
206 Geographically Diverse Clinical Isolates of Herpes Simplex Virus 2. *J Virol* 89(16),
207 8219-8232.
- 208 Norberg, P., Kasubi, M.J., Haarr, L., Bergström, T., Liljeqvist, J.A., 2007. Divergence and
209 recombination of clinical herpes simplex virus type 2 isolates. *J Virol* 81(23), 13158-
210 13167.
- 211 Schmidt-Chanasit, J., Bialonski, A., Heinemann, P., Ulrich, R.G., Günther, S., Rabenau, H.F.,
212 Doerr, H.W., 2010. A 12-year molecular survey of clinical herpes simplex virus type 2
213 isolates demonstrates the circulation of clade A and B strains in Germany. *J Clin Virol*
214 48(3), 208-211.
- 215 Severini, A., Tyler, S.D., Peters, G.A., Black, D., Eberle, R., 2013. Genome sequence of a
216 chimpanzee herpesvirus and its relation to other primate alphaherpesviruses. *Arch Virol*
217 158(8), 1825-1828.
- 218 Smith, G., 2012. Herpesvirus transport to the nervous system and back again. *Annu Rev*
219 *Microbiol* 66, 153-176.
- 220 Terhune, S.S., Coleman, K.T., Sekulovich, R., Burke, R.L., Spear, P.G., 1998. Limited variability
221 of glycoprotein gene sequences and neutralizing targets in herpes simplex virus type 2
222 isolates and stability on passage in cell culture. *J Infect Dis* 178(1), 8-15.
- 223 Thiry, E., Meurens, F., Muylkens, B., McVoy, M., Gogev, S., Thiry, J., Vanderplasschen, A.,
224 Epstein, A., Keil, G., Schynts, F., 2005. Recombination in alphaherpesviruses. *Rev Med*
225 *Virol* 15(2), 89-103.
- 226 Wertheim, J.O., Smith, M.D., Smith, D.M., Scheffler, K., Kosakovsky Pond, S.L., 2014.
227 Evolutionary origins of human herpes simplex viruses 1 and 2. *Mol Biol Evol* 31(9),
228 2356-2364.

229 Table 1. Oligonucleotide primers used in this study

Primer	Genome position	Sequence (5' → 3')	Reference
gB1 For	---	CCCATCCCCTCGAAGAAC	[12]
gB1 Rev	577	CAGACCCCCTTGCGTTAAT	This study
gB2 For	424	TTCAAGGAGAACATCGCCCC	This study
gB2 Rev	744	GGGGTTGTA CTGAGGTCCG	This study
gB3 For	557	ATTAACGCCAAGGGGGTCTG	This study
gB3 Rev	885	GTAGCCGTAAAACGGGGACA	This study
gB4 For	725	CCGACCTCAAGTACAACCCC	This study
gB4 Rev	1164	GGTGAAGGTGGTCGAGATGG	This study
gB5 For	1008	GCTGACGACCCCAAGTTTA	This study
gB5 Rev	1487	TCGATCGAGGAGGTGGTCTT	This study
gB6 For	1158	CCTTCACCACCAACCTGACC	This study
gB6 Rev	1532	CGTGGCGCTGTATGTGGTTA	This study
gB7 For	1464	GCATCAAGACCACCTCCTCG	This study
gB7 Rev	1912	GAAGATGAAGTAGCGCCGGT	This study
gB8 For	1604	CGAGCTGACTCTCTCGAACG	This study
gB8 Rev	2035	CACAAACTCGTGGTCTCCCA	This study
gB9 For	1916	GGGGCTACGTGACTTCGAG	This study
gB9 Rev	2410	ACAGGGCCTTCATGGGATTG	This study
gB10 For	2391	CAATCCCATGAAGGCCCTGT	This study
gB10 Rev	2606	GTGGTGACCTTGAGCTGA	This study

230

231

232 Table 2. Specific mutations found in the gB coding regions of two HHV-2 strains
 233 derived from Brazilian HIV coinfecting women.

234

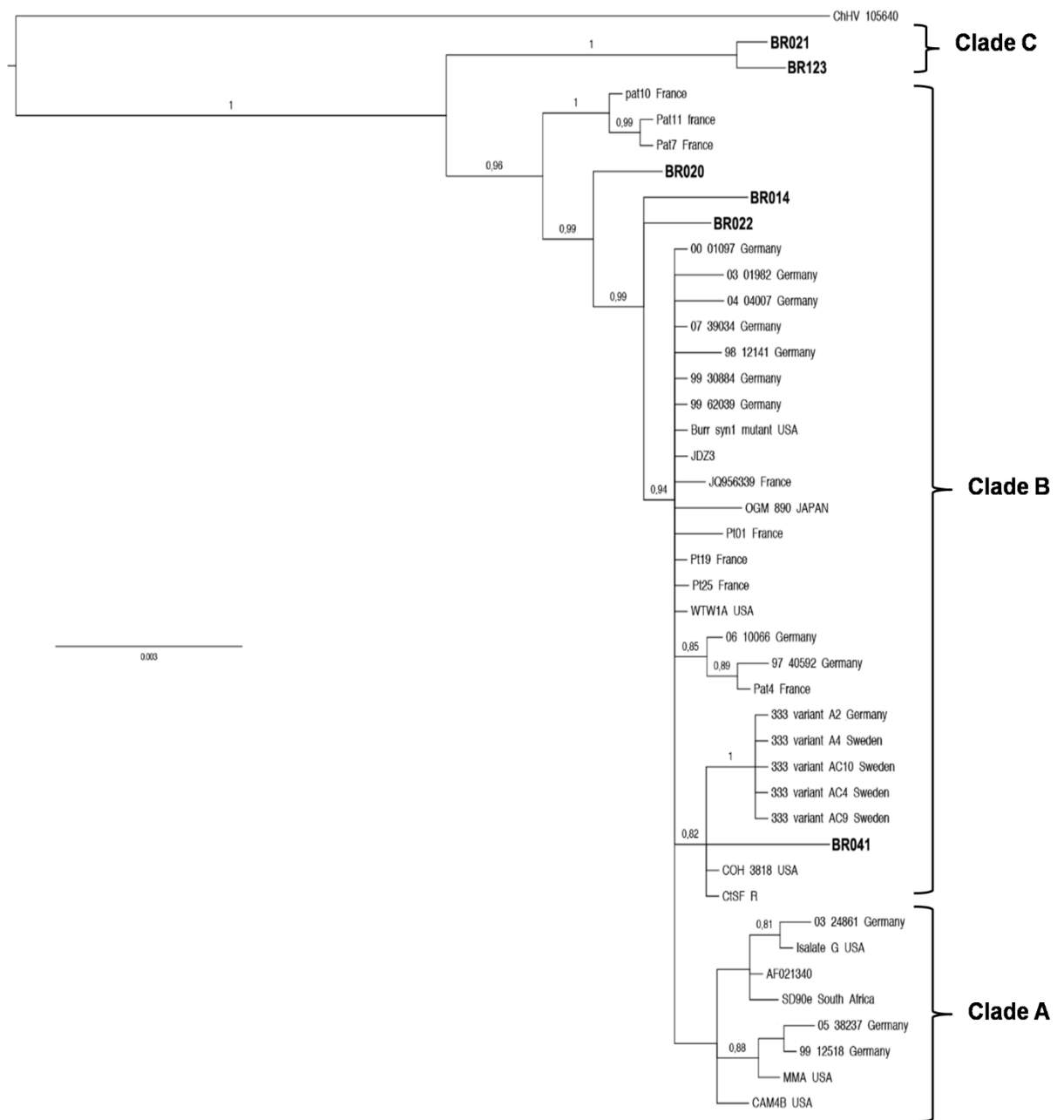
235

Nucleotide change*	Presence in ChHV prototype	Amino acid change
G1254C	No	-
C1323G	No	-
G1411C	No	A471P
C1617G	No	-
C1668G	No	-
C1683G	No	-
G1731C	No	-
G1734A	Yes	-
G1747A	No	V583I
G1761C	Yes	-
G1767C	No	-
C1816T	Yes	-
C1836G	No	-
C1857G	No	-
G1972A	Yes	-
G2001C	No	-

236

237 *Numbering from the initiation codon of the glycoprotein B coding region

240 **Figure 1**-Phylogenetic relationships among HHV-2 based on bayesian analysis of genetic distances generated from
241 comparisons of a 2250 bp fragment of the glycoprotein B sequences. The scale bars indicate an evolutionary distance
242 of 0.003 substitutions per position in the sequence. The numerical value ≥ 0.7 at the node indicates the posterior
243 probability (pp) replicates that supported by the interior branch. The Tamura 3-parameter model with gamma-distributed
244 rate heterogeneity (T92 + G) was selected as the best-fit evolutionary model. The clades were classified according to
245 Norberg et al., 2007 and Schmidt-Chanasit et al., 2010.



5) DISCUSSÃO

No Brasil, estima-se que 640.900 novos casos de herpes genital são diagnosticados a cada ano na população sexualmente ativa do país (OMS, 2014). A prevalência da infecção causada pelo HHV-2 na população geral brasileira é de 11,3%, com predomínio da infecção em indivíduos jovens (Clemens e Farhat, 2010). Estes dados mostram a importância desta infecção para população brasileira e que o diagnóstico da infecção e medidas de controle e prevenção são necessárias para diminuir principalmente a transmissão do vírus.

O diagnóstico do herpes genital na prática clínica é geralmente realizado pela observação das lesões na fase sintomática ou por meio de ensaios sorológicos em exames de rotina pré-natal. A maioria das pessoas que apresenta herpes genital não tem conhecimento de sua infecção já que apenas de 10 a 20% dos indivíduos infectados pelo HHV-2 reportam ter recebido o diagnóstico prévio da infecção (WHO, 2017).

Tradicionalmente, o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HHV-2 era realizado por isolamento viral seguido de tipagem viral, o que requeria pessoal especializado com experiência prática. A necessidade de um diagnóstico rápido e com alta sensibilidade promoveu a popularização das técnicas moleculares (PCR e PCR em tempo real) para a detecção deste vírus (Legoff *et al.*, 2014). O monitoramento e quantificação do HHV realizado pela técnica de PCR em tempo real são importantes porque podem ser utilizados para o monitoramento, diagnóstico e avaliação dos efeitos do uso dos antivirais (Schloss *et al.*, 2009).

A detecção viral por PCR em tempo real fornece informações suficientes sobre várias etapas no processo de infecção a nível molecular, o que é valioso para a prevenção e controle de infecções virais (ISO/TS 15216-1, 2013). A quantificação absoluta de genomas virais por PCR em tempo real tem se tornado uma rotina nos laboratórios, principalmente de pesquisa. Na detecção absoluta, a carga viral é medida como número de cópias por célula ou por RNA/DNA total seguindo a transformação dos dados por meio de uma curva padrão. De acordo

com o “Manual de Informação Mínima para Publicação de Experimentos de PCR em tempo real quantitativo” (Bustin *et al.*, 2009), os ácidos nucleicos usados como padrão para a quantificação absoluta podem ser gerados de origem diferentes: oligonucleotídeos de DNA e RNA sintéticos purificados, fragmento de DNA clonado em plasmídeo e *pools* de DNA/ RNA de referência a partir de amostras biológicas. Tal curva padrão é gerada utilizando diluições seriadas de um fragmento do genoma viral clonado como molde (Bowers e Dhar, 2011).

A utilização da PCR em tempo real para o diagnóstico do herpes permite o uso de diferentes espécimes clínicos, o que possibilita o diagnóstico direto de pacientes assintomáticos. O uso da curva sintética como curva padrão para o diagnóstico do HHV-1 e HHV-2 por PCR em tempo real apresentam grandes vantagens em relação às curvas plasmidiais comumente usadas. Para desenvolver a curva sintética é necessário apenas sintetizar a sequência nucleotídica desenhada, o que facilita a implantação do diagnóstico molecular por PCR em tempo real em laboratórios com pouco espaço e recursos financeiros.

No **artigo 1**, oligonucleotídeos sintéticos desenhados para diferentes glicoproteínas do envelope foram utilizados como curva padrão para os herpes vírus humano 1 e 2. Os resultados demonstraram que estes oligonucleotídeos podem ser usados como molde para a curva padrão, pois exibiram quantificação semelhante às suas respectivas curvas de DNA (padrão ouro).

Apesar do método de quantificação por RT-PCR do presente estudo não ter sido comparado com a norma ISO/TS 15216-1: 2013, o HHV-1 e o HHV-2 provenientes de diferentes espécimes biológicos (swab oral, swab genital, raspado cervical, soro e vírus de cultura celular) foram detectados e quantificados por este método. Desta forma os oligonucleotídeos em questão podem ser utilizados como uma alternativa a curva padrão.

A partir deste trabalho e da otimização da curva sintética e da técnica do PCR em tempo real em diferentes tipos de amostras, percebeu-se a necessidade de contribuir com dados para estimar a epidemiologia do HHV-2 no Brasil a partir de estudos de prevalência e de marcadores moleculares de infecção. Como os dados epidemiológicos da infecção causada pelo HHV-2 são escassos na

população brasileira, iniciamos o estudo focando na população de mulheres já que estas podem transmitir e adquirir o HHV-2 por via sexual para ou dos os seus parceiros e transmitir por via vertical.

A fim de avaliarmos o potencial papel das mulheres na transmissão sexual do HHV-2, iniciamos a investigação epidemiológica em uma população de difícil acesso e de alto risco para as ISTs. **No artigo 2** foram avaliadas 376 mulheres profissionais do sexo (MPS) do Mato Grosso do Sul, que foram recrutadas pelo método de *Respondent Driven Sampling* (RDS), pois o objetivo era conseguir recrutar mulheres de diferentes locais da cidade de Campo Grande, que trabalhassem em todos os tipos de lugares e com diferentes condições socioeconômicas e comportamentais.

A metodologia RDS é um método probabilístico de amostragem em cadeia que fornece uma amostra final independente dos primeiros indivíduos selecionados de maneira não aleatória (sementes), garantindo que a amostra selecionada tenha as características e comportamentos representativos do grupo a ser estudado. No RDS há o controle de viés, incluindo os efeitos da escolha das sementes e das diferenças no tamanho das redes, o que reduz os problemas típicos de outros métodos de amostragem em cadeia (Heckathorn DD., 1997). Outra vantagem do RDS é que, diferente dos outros métodos de amostragem em cadeia, ele não requer a quebra de privacidade para a seleção dos pares que é feita pelo próprio recrutador e não pelo investigador (Heckathorn DD., 1997; 2004). Desta forma a metodologia do RDS vêm sendo muito indicada e utilizada de forma eficiente para o recrutamento de populações de difícil acesso, como as mulheres profissionais do sexo (Liu *et al.*, 2016; Moayedi-Nia *et al.*, 2016; Lyons *et al.*, 2017).

No **artigo 2**, a idade média das participantes foi de 30,8 anos e 72,3% das mulheres profissionais do sexo (MPS) tinham 30 anos ou menos, estes resultados estão em concordância com o que também foi observado por Pogetto *et al.* (2011), Passos *et al.* (2007) e Correa *et al.* (2008) em estudos sobre ISTs entre mulheres profissionais do sexo realizados no Brasil. Como foram recrutadas MPS apenas acima de 18 anos, o nível de escolaridade foi baixo já que 52,4% estudaram até o ensino fundamental ou menos (< que 10 anos de estudo). Este resultado pode estar relacionado ao difícil acesso a escola ou ao

abandono precoce devido, por exemplo, a entrada na prostituição. Outros estudos realizados com MPS no Brasil também mostram que este grupo apresenta baixa escolaridade (Passos *et al.*, 2007; Correa *et al.*, 2008). Estudos realizados na Argentina (Bautista *et al.*, 2009) e no Afeganistão (Todd *et al.*, 2010) mostraram que o nível de escolaridade das MPS era ainda mais baixo, onde a maioria apresentava apenas a educação primária ou eram analfabetas.

Mais da metade das MPS (52,9%) relatou que faz o consumo diário de bebidas alcoólicas e 41,8% relataram que já usaram drogas. A associação do uso de drogas e bebidas alcoólicas na prostituição é justificada como uma maneira para enfrentar a realidade do cotidiano vivenciado, porém pode acarretar outras implicações como violência e desuso de preservativo (Aquino *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010, Correa *et al.*, 2008).

Em relação ao comportamento sexual, 51,6% relataram ter tido menos que sete parceiros sexuais na última semana, mas a média do número de parceiros na última semana foi de 11. Em estudos realizados na Argentina (Bautista *et al.*, 2009) e Itália (Trani *et al.*, 2006), as MPS apresentavam um número médio de parceiros sexuais por semana maior do que a reportada na nossa população: 15 e 35 respectivamente. A grande maioria das MPS (97,2%) reportaram ter usado preservativos na última relação sexual, o que mostra a conscientização das mesmas sobre o sexo seguro como um caminho para evitar ISTs.

A presença de lesões genitais nos últimos 12 meses foi relatada por 4,5% das MPS, sugerindo sinais de alguma IST. A presença de infecções sexualmente transmitidas é comum entre as MPS. Na China 41,5% das MPS estudadas tinham IST, enquanto no México 36,4% apresentam alguma IST (Rusch *et al.*, 2010).

A prevalência do HHV-2 encontrada entre as MPS foi de 47,3%, esta taxa é alta ao compararmos com a população de adultos no Brasil (~30%) (Clemens e Farhat, 2010). No Peru, um estudo realizado com MPS e adultos jovens mostrou discrepâncias entre as taxas de prevalência de 60,6% e 13,5%, respectivamente. Estudos conduzidos com mulheres profissionais do sexo de diferentes províncias da China exibiram taxas de prevalência superiores à encontrada no Brasil, variando de 58,3% a 70,8%. (Wang *et al.*, 2012; Chen *et*

al., 2013). A mesma prevalência encontrada no Brasil foi verificada no estudo conduzido com MPS de Shanghai, na China (47,3%) (Yang *et al.*, 2011). Apesar disso, as diversidades das prevalências encontradas pelo mundo podem ser explicadas por fatores culturais, diferenças demográficas e de comportamento existentes nestes países.

A presença da imunoglobulina M contra o HHV-2 (IgM anti-HHV-2) foi detectada em 10,1% das profissionais do sexo. Porém, a presença deste anticorpo não sugere, necessariamente, uma infecção primária pois durante a reativação da infecção latente pode também haver a reativação da IgM (Tada e Khandelwal, 2012). Baseado nisso, apenas duas MPS estudadas foram consideradas primariamente infectadas (2/38) pelo HHV-2, pois estas apresentaram a IgM sem a presença de IgG e carga viral detectada no sangue.

As duas MPS com infecção primária tiveram o DNA do HHV-2 detectado no sangue sugerindo que o vírus, em casos raros, pode fazer viremia durante a infecção primária embora, geralmente, siga a rota neuronal para se transportar. Na literatura, a detecção do HHV-DNA em amostras de sangue tem sido associada com casos graves como pneumonia, infecção disseminada em neonatos, e também a pacientes imunocomprometidos. Em contrapartida, alguns estudos reportam a presença de viremia em casos de infecção genital primária e herpes oral recorrente (Brice *et al.*, 1992; Johnston *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2010).

Pelo fato de trabalharmos com amostras de conveniência, neste estudo **(artigo 2)** a eliminação do HHV-2 no trato genital não foi investigada, embora a presença do vírus na secreção vaginal seja necessária para que haja a transmissão sexual da mulher para o homem. Em contrapartida, a investigação de anticorpos e do DNA no soro realizada no presente estudo foi importante para o conhecimento da prevalência, patogênese e detecção de viremia durante a infecção primária e recorrente por herpes vírus, além de possibilitar o diagnóstico e demonstrar a presença de viremia em indivíduos assintomáticos.

Na análise estatística univariada e multivariada alguns comportamentos de risco foram associados com a infecção pelo HHV-2 em MPS. O aumento da idade foi relacionado com um aumento da chance de ter a infecção causada pelo

HHV-2. Este achado já foi reportado em estudos prévios, e em geral quanto mais velha é a MPS, mais tempo ela teve para se expor ao vírus caso as medidas de proteção contra a infecção não forem tomadas (Yang *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013). Outro fator associado ao aumento da chance de infecção pelo HHV-2 foi o número de parceiros sexuais na última semana, no qual verificou-se aumento da odds ratio para quantidades maiores de parceiros. Em concordância com os nossos resultados Chonan *et al.* (2009) mostrou que o número de parceiros sexuais está associado com a aquisição de HHV-2 e que o risco de adquirir o HHV-2 aumenta de acordo com o aumento do número de clientes e parceiros sexuais.

Interessantemente, o consumo diário de álcool pelas MPS mostrou-se como um fator protetor para a infecção causada pelo HHV-2, apesar de estudos prévios relatarem que o elevado consumo de álcool pelas MPS estaria associado ao aumento do risco de aquisição de IST. A associação protetora do álcool sobre a prevalência do HHV-2 na nossa população pode ser explicada pelo fato da maioria das mulheres estudadas serem jovens. A prevalência do HHV-2 tende de aumentar com a idade enquanto o consumo de álcool tende a ser mais alto entre os jovens, desta forma temos a possível falsa sensação de que o consumo de álcool protege contra a infecção causada pelo HHV-2 em mulheres jovens.

O uso de preservativo na última relação sexual também se mostrou como um fator protetor, diminuindo em 90% a chance de infecção pelo HHV-2. Apesar disso, verificamos um percentual significativo de MPS infectadas pelo HHV-2 e casos de infecção primária, o que demonstra que este uso do preservativo não foi regular ao longo da vida sexual.

Os HHV além da transmissão sexual, destacam-se como um grande problema durante a gestação, pois estes vírus apresentam a capacidade de serem transmitidos por via congênita e perinatal. Globalmente, estima-se que dos 139 milhões de nascidos vivos durante os anos de 2010-15, 24 milhões destes nasceram de mulheres que tinham a infecção causada por HHV-2 durante a gravidez e que 108 milhões nasceram de mulheres que tinham a infecção causada por HHV-1 (em qualquer sítio) durante a gravidez (Looker *et al.*, 2017).

O herpes neonatal é uma das complicações mais devastadora do herpes genital durante a gestação. Estima-se que a taxa de mortalidade dos neonatos com herpes neonatal chegue a 60% quando não-tratados e 30% quando tratados (Kimberlin, 2007; Corey e Wald, 2009). A falta de estudos prévios acerca da infecção do HHV-2 em gestantes no Brasil dificulta a comunidade médica avaliar o real impacto desta infecção na saúde materno-infantil e a implantação de efetivo tratamento e programas de monitoramento para esta doença. Por este motivo mulheres gestantes HIV negativas e HIV positivas foram respectivamente estudadas no **artigo 3 e 4** desta tese.

No **artigo 3**, 136 gestantes HIV-negativas de um hospital de referência do Rio de Janeiro foram avaliadas. A prevalência do HHV-2 nesta população foi de 20,6%, taxas ligeiramente inferiores foram descritas em estudos realizados com gestantes na Finlândia (11%) (Puhakka *et al.*, 2016), Norte do Brasil (Miranda *et al.*, 2014) (12,3%) e Índia (8,7%) (Biswas *et al.*, 2011). Prevalências superiores à encontrada no nosso estudo foram verificadas na Nigéria (46,3%) (Kalu *et al.*, 2014) e Etiópia (32,1%) (Anjulo *et al.*, 2016). Neste estudo, as gestantes com mais de 30 anos tiveram 3,8 vezes mais chance em ser exposta ao HHV-2 quando comparada às gestantes com menos de 30 anos. A relação entre a idade e prevalência do HHV-2 é bem estabelecida já que indivíduos jovens e adultos são os mais comumente afetados por se tratar de uma infecção cuja principal forma de transmissão é a via sexual. A viremia do HHV-2 foi investigada por qPCR em todas as gestantes incluídas no estudo, porém apenas uma paciente, que foi diagnosticada com infecção primária, apresentou baixa carga viral do HHV-2 no sangue ($2,3 \times 10^3$ cópias/mL). Por se tratar de uma paciente gestante, o tratamento antiviral é indicado a fim de evitar a transmissão transplacentária do HHV-2.

No **artigo 4**, 134 gestantes portadoras do HIV e provenientes do Rio de Janeiro foram avaliadas. Esta população foi composta por mulheres jovens com idade mediana de 25 anos, 76% dessas mulheres apresentavam menos de 30 anos. Dado semelhante ao encontrado no nosso estudo foi verificado em gestantes HIV-positivas na Tanzânia, onde a idade média era de 25 anos, e nos Camarões onde 54,7% da população tinha menos que 25 anos (Chaula *et al.*, 2017; Sama *et al.*, 2017). Estudos realizados no Brasil mostram que a maior

frequência da infecção do HIV ocorre em mulheres jovens. No Pará, 42,1% das gestantes infectadas pelo HIV apresentaram entre 18 e 23 anos (Menezes et al., 2012) e no Espírito Santo (Vitória), a média de idade das gestantes HIV-positivas foi de 24,3 anos (Vieira et al., 2011). Estes dados demonstram a “juvenilização” da epidemia que é uma característica de países em desenvolvimento, onde as mulheres iniciam a vida reprodutiva muito cedo (Carvalho *et al.*, 2008).

O nível de escolaridade das gestantes HIV - positivas foi considerado bom, já que 69% delas tinham completado o ensino médio. Segundo dados do IBGE de 2014, apenas 44,5% das mulheres brasileiras acima dos 25 anos completam o ensino médio. O nível de escolaridade das participantes do estudo foi superior aos estudos realizados na Tanzânia, onde apenas 20,5% das gestantes HIV tinham completado o ensino médio (Chaula et al., 2017). A renda familiar de 88% da nossa população foi menor que 660 reais, representando o baixo nível socioeconômico da população residente na Baixada Fluminense da cidade do Rio de Janeiro.

Em relação aos dados coletados sobre a rotina pré-natal, 79,9% das gestantes HIV-positivas reportaram história de IST antes da gravidez atual. Por ser uma população vulnerável a infecções, as prevalências de outras ISTs em gestantes portadores do HIV no Brasil geralmente são muito altas devido ao sinergismo biológico (Travassos et. al 2012). Um estudo de metanálise mostrou que pacientes com diferentes ISTs ulcerativas apresentaram taxas significativas de soroconversão para o HIV (Sexton, 2005).

Neste estudo foi encontrada uma alta taxa (59,7%) de gestantes HIV-positivas que já haviam sido expostas ao HHV-2. Na literatura são escassos os estudos que investigam a prevalência da coinfeção HHV-2 e HIV em gestantes, o que dificulta a comparação da população estudada com outras partes do mundo. Dentre os estudos disponíveis, a prevalência mais próxima à encontrada no nosso estudo foi achada em gestantes portadoras do HIV da Ucrânia (68%) (Aebi-Popp *et al.*, 2016), enquanto taxas de prevalência menor (28,7%) e maior (86%) para o HHV-2 foram encontradas, respectivamente, em Washington (EUA) e em Uganda, na África (Nakubulwa *et al.*, 2009; Patterson *et al.*, 2011).

A prevalência encontrada em gestantes HIV-positivas (**artigo 4**) foi quase 3 vezes maior que a encontrada em gestantes HIV-negativas do Rio de Janeiro (**no artigo 3**). Esta diferença pode ser explicada pelo fato do HHV-2 e o HIV compartilharem da mesma forma de transmissão, o que facilita a existência da coinfeção entre esses vírus. A presença da infecção genital pelo HHV-2 aumenta a probabilidade de aquisição do HIV devido ao aparecimento das microlesões causadas pela infecção do HHV-2 na região genital, o que expõe células imunes da epiderme e derme ao HIV-1 (Duluc *et al.*, 2013). Em contrapartida, a infecção do HHV-2 é associada à depleção da resposta imune celular, o que ocorre em pacientes HIV-positivos, assim, a reativação do HHV-2 é mais frequente em pacientes HIV-positivos (Mayaud *et al.*, 2009).

No **artigo 4**, todas as gestantes HIV-positivas tiveram a viremia do HHV-2 investigada e o DNA viral foi encontrado nas amostras de soro ou plasma de cinco pacientes. Três destas (3/5) apresentaram sorologia positiva para a IgG anti HHV-2, sugerindo a infecção passada, e duas apresentaram IgM anti HHV-2 reagente, sugerindo infecção primária. Entre as cinco gestantes com viremia detectada, três (3/5) apresentaram lesões genitais durante a exame clínica. Uma destas apresentou um caso de recorrência do herpes genital, já que possuía a IgG reagente e viremia detectada. Em concordância com o nosso resultado, estudos detectaram o HHV-DNA em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e sangue total de pacientes com herpes recorrente (Brice *et al.*, 1992; Bezold *et al.*, 2000).

Dois pacientes com IgG anti HHV-2 reagentes apresentaram viremia e foram assintomáticas para herpes genital e oral na exame clínica. Em concordância com o nosso achado, um estudo desenvolvido pela nossa equipe mostrou significativa detecção do DNA do HHV-1 no soro de pacientes HIV-positivos sem sintomas de herpes, sugerindo a possibilidade de este evento ocorrer em pacientes imunocomprometidos (Perse Da Silva *et al.*, 2015).

Apesar da excreção genital do HHV-2 não ter sido investigada no **artigo 4**, duas gestantes HIV-positivas com IgG reagente apresentaram níveis detectáveis do HHV-2 DNA no sangue durante um episódio de infecção assintomática. Desta forma apesar de não exibirem a infecção genital, a

possibilidade de transmissão congênita do HHV-2 deve ser considerada e a presença de viremia durante infecção materna assintomática representa um achado relevante que precisa ser melhor investigado. Recentemente, mães assintomáticas e soropositivas para o HHV-2 transmitiram de forma congênita e assintomática o vírus para seus bebês. Os bebês nasceram sem sintomas de herpes neonatal, mas foram diagnosticados com o HHV-2, a partir da detecção do DNA viral dias após o nascimento (Tavakoli *et al.*, 2017).

Duas gestantes com viremia detectada e soropositivas apenas para IgM anti HHV-2 apresentaram infecção genital sintomática. A presença da IgM, neste caso, sugere uma infecção primária materna o que traduz um alto risco para a aquisição de herpes neonatal, uma vez que a transmissão vertical é significativamente mais comum durante a infecção primária do que durante a infecção recorrente (Brown *et al.*, 2003).

Entre as gestantes com IgG anti HHV-2, a relação CD4/CD8 > 1 e a idade abaixo de 20 anos se mostraram como fator de proteção, diminuindo significativamente a chance de coinfeção HIV/HHV-2. Resultados similares têm sido reportados em estudos prévios que mostram que a positividade ao HHV-2 aumenta com a idade devido ao maior tempo de exposição sexual (ACOG Practice Bulletin. 2007) e que uma alta da relação CD4/CD8 em pacientes HIV-positivos demonstram uma melhora na resposta imune celular levando a diminuição da ocorrência de infecções.

Uma quantidade significativa de gestantes (38,1%) do **artigo 4** só foram diagnosticadas como portadoras do HIV durante os exames do pré-natal que precederam o nosso estudo. Este fato enfatiza a necessidade de mais investimento em programas de testagem para o HIV e de acesso a saúde para mulheres, objetivando evitar a transmissão vertical do HIV bem com do HHV -2.

De maneira geral, **os estudos 3 e 4** desta tese apesar de possuírem suas limitações, serviram para demonstrar o panorama epidemiológico do HHV-2 nas gestantes do Rio de Janeiro e servirão para reforçar que a testagem pré-natal do HHV-2 deve ser considerada como uma importante ferramenta para o diagnóstico, tratamento e prevenção da transmissão do HHV-2 tanto para os parceiros sexuais quanto para os neonatos, contribuindo para evitar

complicações e desfechos graves. Os dados gerados nesses artigos poderão ser utilizados e consultados para a confecção de manuais do Ministério da Saúde, boletins epidemiológicos e poderão servir de base para estudos epidemiológicos no Brasil.

Após conhecer o padrão epidemiológico da infecção do HHV-2 em mulheres, o estudo de caracterização molecular do HHV-2 foi iniciado dando como resultado o **artigo 5** desta tese. Pouco se estuda sobre os genótipos circulantes do HHV-2 no mundo. Os estudos de análise filogenética realizados com os genes que codificam as glicoproteínas G, I, E, B classificaram as cepas da Europa, América do Norte, Ásia e África em dois genogrupos, A e B (Norberg *et al.*, 2007; Schmidt-Chanasit *et al.*, 2010). Entretanto, até o presente momento não existem dados disponíveis sobre as cepas circulantes no Brasil.

Neste estudo, foi realizado o sequenciamento completo do gene que codifica a glicoproteína B (codificada pela UL27). Foram sequenciadas seis cepas, sendo duas delas provenientes de pacientes HIV-positivas. A análise da gB revelou que as cepas brasileiras foram classificadas em dois clados distintos. O primeiro clado foi composto por 4 cepas brasileiras que apresentaram alta identidade com as cepas européias, asiáticas e norte americanas do clado B. Dentre todas as 140 cepas disponíveis caracterizadas a partir do gene da UL27, o clado B tem se apresentado como o genogrupo mais frequente no mundo.

As duas cepas provenientes de mulheres HIV-positivas (BR21 e BR123) apresentaram distância genética maior que 1% das quatro cepas brasileiras e das cepas do clado A e B previamente descritas no mundo. Dezesseis substituições nucleotídicas únicas foram compartilhadas nas sequências da gB de BR21 e BR123. A região genômica que codifica a gB é uma das mais conservadas do genoma dos HHV e estudos prévios demonstram uma divergência média de 0,5% entre sequência descritas (Lamers *et al.*, 2015). **No artigo 5**, as cepas provenientes de mulheres HIV-positivas (BR21 e BR123) apresentaram mais que o dobro da divergência sugerida para esta região genômica, por este motivo e baseado na topologia da árvore filogenética gerada por análise bayesiana, sugerimos que estas cepas deveriam ser classificadas como variantes do HHV-2 pertencentes a um novo clado genético, o clado C.

As variantes do HHV-2 classificadas no clado C foram provenientes de mulheres HIV-positivas. Em concordância com o nosso resultado novas variantes do HHV-2 já foram previamente detectadas em pacientes HIV positivos, porém a divergência foi verificada para as regiões da UL-30 (DNA polimerase) e da US4 (glicoproteína G) (Burrel *et al.*, 2013). As variantes BR21 and BR123 apresentaram 12 novas mutações novas e 4 mutações em comum com o ChHV. As transversões C-G e G-C foram a mais frequentes substituições nucleotídicas verificadas (11/12) e duas trocas de aminoácidos foram verificadas em ambas as cepas (A 471 P e V 583 I). As alterações específicas encontradas nas cepas proveniente de pacientes HIV-positivos podem sugerir assinaturas moleculares da coinfeção HHV-2/HIV em mulheres brasileiras.

A glicoproteína B é uma proteína do envelope viral e está intimamente relacionada com o processo de adsorção viral (Thiry *et al.*, 2005), desta forma as alterações nucleotídicas no gene da gB podem levar à mudanças no tropismo celular e patogênese. Diante deste fato, é importante investigar a relação entre a gB variante e sua interação com o heparan sulfato e receptores de entrada, assim pode-se verificar o real impacto destas variantes na patogênese da coinfeção HHV-2/HIV.

De maneira geral, os resultados encontrados nesta tese contribuíram para facilitar o estabelecimento da técnica de PCR em tempo real, o que possibilita a implantação de um diagnóstico rápido, específico, quantitativo, capaz de detectar a infecção lítica em pacientes assintomáticos, e também estimou a prevalência e identificou os comportamentos de risco associados a infecção do HHV-2 em diferentes grupo de mulheres, focando na importância das mesmas para transmissão sexual e transversal deste vírus com o intuito de alertar as autoridades competentes quanto à intensificação de programas de monitoramento e promoção a saúde da mulher e materno-infantil. Além disso, esta tese contribuiu com a caracterização molecular das primeiras cepas brasileiras do HHV-2 e sugeriu a existência de um novo clado de classificação para as cepas provenientes de pacientes com HIV, o que pode impactar nos futuros estudos associados à patogênese do HHV2 em pacientes portadores do HIV, na terapia antiviral e no desenvolvimento de vacinas e kits diagnósticos.

6) CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que:

- ✓ As curvas de oligonucleotídeos sintéticos desenhadas para o HHV-1 e HHV-2 podem ser utilizadas como curva padrão para a quantificação absoluta destes vírus por PCR em tempo real e contribuir para o diagnóstico destas infecções sexualmente transmitidas.

- ✓ Mulheres profissionais mais velhas, com grande número de parceiros e com renda familiar alta estão mais expostas a contrair o HHV-2 no Mato Grosso do Sul, desta forma programas de prevenção e controle devem ser dirigidos a esta população a fim de freiar a transmissão sexual deste vírus.

- ✓ A prevalência do HHV-2 em gestantes HIV positivas do Rio de Janeiro foi três vezes maior que a prevalência de gestantes HIV negativas, o que demonstra o sinergismo do HHV-2 e HIV em mulheres gestantes no Brasil, e o risco aumentado de transmissão neonatal do HHV-2 em pacientes portadoras do HIV.

- ✓ Segundo os resultados obtidos nos artigos 2, 3 e 4, o HHV-2 pode fazer viremia durante o ciclo lítico em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos durante a infecção primária ou recorrente com ou sem a apresentação de manifestação clínica do herpes genital.

- ✓ A grande divergência encontrada nas duas cepas provenientes de pacientes portadores do HIV no Brasil (BR21 e BR123) sugere a existência de um terceiro clado genético para a classificação molecular do HHV-2 e alerta para a emergência de novas variantes em pacientes HIV-positivos.

- ✓ Os resultados sorológicos e moleculares encontrados nesta tese contribuíram para a padronização do diagnóstico molecular, epidemiologia e epidemiologia molecular do HHV-2 no Brasil, o que favorece na vigilância da infecção, principalmente para os grupos mais suscetíveis da população (portadores do HIV, gestantes e profissionais do sexo) além de auxiliar para futuros estudos de desenvolvimento e aplicação de vacinas e outras medidas profiláticas.

7) REFERÊNCIAS

ABAITUA, F.; O'HARE, P. Identification of a highly conserved, functional nuclear localization signal within the N-terminal region of herpes simplex virus type 1 VP1-2 tegument protein. **J Virol**, v. 82, n. 11, p. 5234-44, Jun 2008. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18385239> >.

ABOUD, S. et al. Genital tract infections among HIV-infected pregnant women in Malawi, Tanzania and Zambia. **Int J STD AIDS**, v. 19, n. 12, p. 824-32, Dec 2008. ISSN 0956-4624. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19050213> >.

ACE, C. I. et al. Construction and characterization of a herpes simplex virus type 1 mutant unable to transduce immediate-early gene expression. **J Virol**, v. 63, n. 5, p. 2260-9, May 1989. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2539517> >.

AEBI-POPP, K. et al. High prevalence of herpes simplex virus (HSV)- type 2 co-infection among HIV-positive women in Ukraine, but no increased HIV mother-to-child transmission risk. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 16, p. 94, Apr 2016. ISSN 1471-2393. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27121953> >.

AHO, J. et al. Prevalence of HIV, human papillomavirus type 16 and herpes simplex virus type 2 among female sex workers in Guinea and associated factors. **Int J STD AIDS**, v. 25, n. 4, p. 280-8, Mar 2014. ISSN 1758-1052. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24216036> >.

ALIDJINO, E. K. et al. Persistent viral DNA detection in blood after primary herpes simplex 1 infection revealed by hepatitis with hemophagocytic syndrome. **J Clin Virol**, v. 69, p. 101-3, Aug 2015. ISSN 1873-5967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26209389> >.

ANJULO, A. A. et al. Seroprevalence and risk factors of herpes simplex virus-2 among pregnant women attending antenatal care at health facilities in Wolaita zone, Ethiopia. **Virol J**, v. 13, p. 43, Mar 2016. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26979484> >.

ANZIVINO, E. et al. Herpes simplex virus infection in pregnancy and in neonate: status of art of epidemiology, diagnosis, therapy and prevention. **Virol J**, v. 6, p. 40, Apr 2009. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19348670> >.

ARI, J. et al. Entry of herpes simplex virus 1 and other alphaherpesviruses via the paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha. **J Virol**, v. 83, n. 9, p. 4520-7, May 2009. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19244335> >.

ASTUTO, M. et al. Fatal pulmonary disease and encephalic complication in a man with HSV-1 Infection: a case report. **J Clin Virol**, v. 59, n. 1, p. 59-62, Jan 2014. ISSN 1873-5967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24326294> >.

AWASTHI, S. et al. An HSV-2 Trivalent Vaccine Is Immunogenic in Rhesus Macaques and Highly Efficacious in Guinea Pigs. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 1, p. e1006141, Jan 2017. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28103319> >.

BALFOUR, H. H. Resistance of herpes simplex to acyclovir. **Ann Intern Med**, v. 98, n. 3, p. 404-6, Mar 1983. ISSN 0003-4819. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6299155> >.

BARNABAS, R. V. et al. Impact of herpes simplex virus type 2 on HIV-1 acquisition and progression in an HIV vaccine trial (the Step study). **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 57, n. 3, p. 238-44, Jul 2011. ISSN 1944-7884. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21860356> >.

BARZILAI, A. et al. The herpes simplex virus type 1 vhs-UL41 gene secures viral replication by temporarily evading apoptotic cellular response to infection: Vhs-UL41 activity might require interactions with elements of cellular mRNA degradation machinery. **J Virol**, v. 80, n. 1, p. 505-13, Jan 2006. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16352574> >.

BATRA, D. et al. The incidence and presentation of neonatal herpes in a single UK tertiary centre, 2006-2013. **Arch Dis Child**, v. 99, n. 10, p. 916-21, Oct 2014. ISSN 1468-2044. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24919712> >.

BAUTISTA, C. T. et al. Sexual practices, drug use behaviors, and prevalence of HIV, syphilis, hepatitis B and C, and HTLV-1/2 in immigrant and non-immigrant female sex workers in Argentina. **J Immigr Minor Health**, v. 11, n. 2, p. 99-104, Apr 2009. ISSN 1557-1912. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18175218> >.

BERARDI, A. et al. Fatal pneumonia following maternal HSV-1 viraemia in late pregnancy. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 28, n. 14, p. 1694-6, 2015. ISSN 1476-4954. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25231597> >.

BERNSTEIN, D. I. et al. Epidemiology, clinical presentation, and antibody response to primary infection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in young women. **Clin Infect Dis**, v. 56, n. 3, p. 344-51, Feb 2013. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23087395> >.

BERRINGTON, W. R. et al. Clinical correlates of herpes simplex virus viremia among hospitalized adults. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 9, p. 1295-301, Nov 2009. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19807272> >.

BEZOLD, G. et al. Quantitation of herpes simplex DNA in blood during aciclovir therapy with competitive PCR ELISA. **Dermatology**, v. 201, n. 4, p. 296-9, 2000. ISSN 1018-8665. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11146337> >.

BIANCO, E. et al. Effectiveness of immune globulins in preventing infectious hepatitis and hepatitis A: a systematic review. **Dig Liver Dis**, v. 36, n. 12, p. 834-42, Dec 2004. ISSN 1590-8658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15646432> >.

BISWAS, D. et al. Seroprevalence and risk factors of herpes simplex virus type-2 infection among pregnant women in Northeast India. **BMC Infect Dis**, v. 11, p. 325, 2011. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22111810> >.

BLOOM, D. C.; GIORDANI, N. V.; KWIATKOWSKI, D. L. Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1799, n. 3-4, p. 246-56, 2010 Mar-Apr 2010. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20045093> >.

BOWERS, R. M.; DHAR, A. K. Effect of template on generating a standard curve for absolute quantification of an RNA virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Mol Cell Probes**, v. 25, n. 1, p. 60-4, Feb 2011. ISSN 1096-1194. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21193027> >.

BRADY, R. C.; BERNSTEIN, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Res**, v. 61, n. 2, p. 73-81, Feb 2004. ISSN 0166-3542. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14670580> >.

BRICE, S. L. et al. Detection of herpes simplex virus DNA in the peripheral blood during acute recurrent herpes labialis. **J Am Acad Dermatol**, v. 26, n. 4, p. 594-8, Apr 1992. ISSN 0190-9622. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1317892> >.

BROWN, Z. A. et al. The acquisition of herpes simplex virus during pregnancy. **N Engl J Med**, v. 337, n. 8, p. 509-15, Aug 1997. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9262493> >.

_____. Effect of serologic status and cesarean delivery on transmission rates of herpes simplex virus from mother to infant. **JAMA**, v. 289, n. 2, p. 203-9, Jan 2003. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517231> >.

BURREL, S. et al. Detection of a new variant of herpes simplex virus type 2 among HIV-1-infected individuals. **J Clin Virol**, v. 57, n. 3, p. 267-9, Jul 2013. ISSN 1873-5967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23567026> >.

_____. Ancient recombination events between human herpes simplex viruses. **Mol Biol Evol**, Mar 2017. ISSN 1537-1719. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28369565> >.

_____. Genetic Diversity within Alpha herpesviruses: Characterization of a Novel Variant of Herpes Simplex Virus 2. **J Virol**, v. 89, n. 24, p. 12273-83, Dec 2015. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26401046> >.

BURROWS, J. et al. Detection and subtyping of Herpes simplex virus in clinical samples by LightCycler PCR, enzyme immunoassay and cell culture. **BMC Microbiol**, v. 2, p. 12, Jun 2002. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12069697> >.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**, v. 55, n. 4, p. 611-22, Apr 2009. ISSN 1530-8561. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19246619> >.

CALDEIRA, T. D. et al. Prevalence of herpes simplex virus type 2 and risk factors associated with this infection in women in southern Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 55, n. 5, p. 315-21, 2013 Sep-Oct 2013. ISSN 1678-9946. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24037285> >.

CALLÉ, A. et al. Nucleolin is required for an efficient herpes simplex virus type 1 infection. **J Virol**, v. 82, n. 10, p. 4762-73, May 2008. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18321972> >.

CAPRETTI, M. G. et al. Herpes Simplex Virus 1 infection: misleading findings in an infant with disseminated disease. **New Microbiol**, v. 36, n. 3, p. 307-13, Jul 2013. ISSN 1121-7138. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23912873> >.

CARROZZA, M. J.; DELUCA, N. A. Interaction of the viral activator protein ICP4 with TFIID through TAF250. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 6, p. 3085-93, Jun 1996. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8649420 >.

CHAULA, T. et al. Urinary Tract Infections among HIV-Positive Pregnant Women in Mwanza City, Tanzania, Are High and Predicted by Low CD4+ Count. **Int J Microbiol**, v. 2017, p. 4042686, 2017. ISSN 1687-918X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28255302> >.

CHEN, N. E. et al. Correlates of STI symptoms among female sex workers with truck driver clients in two Mexican border towns. **BMC Public Health**, v. 12, p. 1000, Nov 2012. ISSN 1471-2458. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23164289> >.

CHEN, S. et al. Seropositivity and risk factors for herpes simplex virus type 2 infection among female sex workers in Guangxi, China. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69697, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23894526> >.

CHERPES, T. L.; MATTHEWS, D. B.; MARYAK, S. A. Neonatal herpes simplex virus infection. **Clin Obstet Gynecol**, v. 55, n. 4, p. 938-44, Dec 2012. ISSN 1532-5520. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23090462> >.

CHOWDHURY, S. et al. The amino terminus of herpes simplex virus 1 glycoprotein K is required for virion entry via the paired immunoglobulin-like type-2 receptor alpha. **J Virol**, v. 87, n. 6, p. 3305-13, Mar 2013. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23302878> >.

CLEMENS, S. A.; FARHAT, C. K. Seroprevalence of herpes simplex 1-2 antibodies in Brazil. **Rev Saude Publica**, v. 44, n. 4, p. 726-34, Aug 2010. ISSN 1518-8787. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676563> >.

COHEN, J. A. et al. Herpes simplex virus seroprevalence and seroconversion among active duty US air force members with HIV infection. **J Clin Virol**, v. 74, p. 4-7, Jan 2016. ISSN 1873-5967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26615389> >.

COPELAND, A. M.; NEWCOMB, W. W.; BROWN, J. C. Herpes simplex virus replication: roles of viral proteins and nucleoporins in capsid-nucleus attachment. **J Virol**, v. 83, n. 4, p. 1660-8, Feb 2009. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19073727> >.

COREY, L.; WALD, A. Maternal and neonatal herpes simplex virus infections. **N Engl J Med**, v. 361, n. 14, p. 1376-85, Oct 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19797284> >.

COREY, L. et al. The effects of herpes simplex virus-2 on HIV-1 acquisition and transmission: a review of two overlapping epidemics. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 35, n. 5, p. 435-45, Apr 2004. ISSN 1525-4135. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15021308> >.

_____. Once-daily valacyclovir to reduce the risk of transmission of genital herpes. **N Engl J Med**, v. 350, n. 1, p. 11-20, Jan 1 2004. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14702423 >.

CÁRCAMO, C. P. et al. Prevalences of sexually transmitted infections in young adults and female sex workers in Peru: a national population-based survey. **Lancet Infect Dis**, v. 12, n. 10, p. 765-73, Oct 2012. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22878023> >.

CÁSTKOVÁ, J.; BENES, C. Increase in hepatitis A cases in the Czech Republic in 2008 - an update. **Euro Surveill**, v. 14, n. 3, Jan 2009. ISSN 1560-7917. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19161729> >.

DA SILVA, A. O. S. et al. Epidemiological evaluation of herpes simplex virus in men who have sex with men in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Sex Transm Infect**, v. 91, n. 3, p. 182, May 2015. ISSN 1472-3263. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25253761> >.

DAIKOKU, T. et al. Novel deletion in glycoprotein G forms a cluster and causes epidemiologic spread of herpes simplex virus type 2 infection. **J Med Virol**, v. 85, n. 10, p. 1818-28, Oct 2013. ISSN 1096-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23861013> >.

DAMBROSI, S. et al. Neurovirulence and latency of drug-resistant clinical herpes simplex viruses in animal models. **J Med Virol**, v. 82, n. 6, p. 1000-6, May 2010. ISSN 1096-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20419814> >.

DE BRUYN, G. et al. A randomized controlled trial of a replication defective (gH deletion) herpes simplex virus vaccine for the treatment of recurrent genital herpes among immunocompetent subjects. **Vaccine**, v. 24, n. 7, p. 914-20, Feb 2006. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16213066> >.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. **J Clin Virol**, v. 30, n. 2, p. 115-33, Jun 2004. ISSN 1386-6532. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15125867> >.

DE PAULA, V. S.; VILLAR, L. M.; COIMBRA GASPAR, A. M. Comparison of four extraction methods to detect hepatitis A virus RNA in serum and stool samples. **Braz J Infect Dis**, v. 7, n. 2, p. 135-41, Apr 2003. ISSN 1413-8670. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12959685> >.

DESHMANE, S. L.; FRASER, N. W. During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. **J Virol**, v. 63, n. 2, p. 943-7, Feb 1989. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2536115> >.

DODD, K. C. et al. Herpes simplex virus encephalitis in pregnancy - a case report and review of reported patients in the literature. **BMC Res Notes**, v. 8, p. 118, Apr 2015. ISSN 1756-0500. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25888964> >.

DONNAN, E. J. et al. A multistate outbreak of hepatitis A associated with semidried tomatoes in Australia, 2009. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 6, p. 775-81, Mar 2012. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22238166> >.

DU, T.; ZHOU, G.; ROIZMAN, B. HSV-1 gene expression from reactivated ganglia is disordered and concurrent with suppression of latency-associated transcript and miRNAs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 46, p. 18820-4, Nov 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22065742> >.

DULUC, D. et al. Functional diversity of human vaginal APC subsets in directing T-cell responses. **Mucosal Immunol**, v. 6, n. 3, p. 626-38, May 2013. ISSN 1935-3456. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23131784> >.

ENGELBERG, R. et al. Natural history of genital herpes simplex virus type 1 infection. **Sex Transm Dis**, v. 30, n. 2, p. 174-7, Feb 2003. ISSN 0148-5717. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12567178> >.

FATAHZADEH, M.; SCHWARTZ, R. A. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. **J Am Acad Dermatol**, v. 57, n. 5, p. 737-63; quiz 764-6, Nov 2007. ISSN 1097-6787 (Electronic)

0190-9622 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17939933 >.

FILÉN, F. et al. Duplex real-time polymerase chain reaction assay for detection and quantification of herpes simplex virus type 1 and herpes simplex virus type 2 in genital and cutaneous lesions. **Sex Transm Dis**, v. 31, n. 6, p. 331-6, Jun 2004. ISSN 0148-5717. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15167640> >.

FREDERICK, D. M.; BLAND, D.; GOLLIN, Y. Fatal disseminated herpes simplex virus infection in a previously healthy pregnant woman. A case report. **J Reprod Med**, v. 47, n. 7, p. 591-6, Jul 2002. ISSN 0024-7758. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12170540> >.

FUJIWARA, K. et al. Hepatitis A viral load in relation to severity of the infection. **J Med Virol**, v. 83, n. 2, p. 201-7, Feb 2011. ISSN 1096-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21181913> >.

GARCÍA-AGUIRRE, L.; CRISTINA, J. Analysis of the full-length genome of hepatitis A virus isolated in South America: heterogeneity and evolutionary constraints. **Arch Virol**, v. 153, n. 8, p. 1473-8, 2008. ISSN 0304-8608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18594941> >.

GARDELLA, C.; BROWN, Z. Prevention of neonatal herpes. **BJOG**, v. 118, n. 2, p. 187-92, Jan 2011. ISSN 1471-0528. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21159118> >.

GOWLAND, P. et al. Molecular and serologic tracing of a transfusion-transmitted hepatitis A virus. **Transfusion**, v. 44, n. 11, p. 1555-61, Nov 2004. ISSN 0041-1132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15504159> >.

GU, B.; DELUCA, N. Requirements for activation of the herpes simplex virus glycoprotein C promoter in vitro by the viral regulatory protein ICP4. **J Virol**, v. 68, n. 12, p. 7953-65, Dec 1994. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7966586 >.

GUO, L. et al. Herpes simplex virus 1 ICP22 inhibits the transcription of viral gene promoters by binding to and blocking the recruitment of P-TEFb. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45749, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23029222> >.

GUTIERREZ, C. et al. A unique presentation of acute liver failure from herpes simplex virus hepatitis. **Transpl Infect Dis**, v. 18, n. 4, p. 592-4, Aug 2016. ISSN 1399-3062. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27222930> >.

HAAG, L. M. et al. Herpes Simplex Virus Sepsis in a Young Woman with Crohn's Disease. **J Crohns Colitis**, v. 9, n. 12, p. 1169-73, Dec 2015. ISSN 1876-4479. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26351382> >.

HAN, L. et al. Differences in risk behaviours and HIV/STI prevalence between low-fee and medium-fee female sex workers in three provinces in China. **Sex Transm Infect**, v. 92, n. 4, p. 309-15, Jun 2016. ISSN 1472-3263. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26474599> >.

HANCOCK, M. H.; CORCORAN, J. A.; SMILEY, J. R. Herpes simplex virus regulatory proteins VP16 and ICP0 counteract an innate intranuclear barrier to viral gene expression. **Virology**, v. 352, n. 1, p. 237-52, Aug 15 2006. ISSN 0042-6822 (Print)

0042-6822 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16750236 >.

HEMELAAR, S. J. et al. Neonatal herpes infections in The Netherlands in the period 2006-2011. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 28, n. 8, p. 905-9, May 2015. ISSN 1476-4954. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25014318> >.

HILL, A. et al. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. **Nature**, v. 375, n. 6530, p. 411-5, Jun 1 1995. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7760935 >.

HOFF, N. P.; GERBER, P. A. Herpetic whitlow. **CMAJ**, v. 184, n. 17, p. E924, Nov 2012. ISSN 1488-2329. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546886> >.

HOLLIER, L. M.; WENDEL, G. D. Third trimester antiviral prophylaxis for preventing maternal genital herpes simplex virus (HSV) recurrences and neonatal infection. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD004946, Jan 2008. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18254066> >.

HOLT, E. W. et al. Acute liver failure caused by herpes simplex virus in a pregnant patient: is there a potential role for therapeutic plasma exchange? **J Clin Apher**, v. 28, n. 6, p. 426-9, Dec 2013. ISSN 1098-1101. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23857723> >.

HOOK, E. W. A Recommendation Against Serologic Screening for Genital Herpes Infection-What Now? **JAMA**, v. 316, n. 23, p. 2493-2494, 12 2016. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27997636> >.

HU, Q. H. et al. Prevalence and determinants of HSV-2/syphilis co-infection and HSV-2 mono-infection among HIV-positive men who have sex with men: a cross-sectional study in Northeast China. **Jpn J Infect Dis**, Oct 2016. ISSN 1884-2836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27795468> >.

JAMES, S. H.; KIMBERLIN, D. W. Neonatal herpes simplex virus infection: epidemiology and treatment. **Clin Perinatol**, v. 42, n. 1, p. 47-59, viii, Mar 2015. ISSN 1557-9840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25677996> >.

JAQUES, D. A. et al. Herpes simplex encephalitis as a complication of neurosurgical procedures: report of 3 cases and review of the literature. **Virol J**, v. 13, p. 83, May 2016. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27216026> >.

JENKINS, F. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus 1 recombinants with noninverting genomes frozen in different isomeric arrangements are capable of independent replication. **J Virol**, v. 59, n. 2, p. 494-9, Aug 1986. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3016310> >.

JENKINS, H. L.; SPENCER, C. A. RNA polymerase II holoenzyme modifications accompany transcription reprogramming in herpes simplex virus type 1-infected cells. **J Virol**, v. 75, n. 20, p. 9872-84, Oct 2001. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11559820> >.

JOHNSTON, C. et al. Herpes simplex virus viremia during primary genital infection. **J Infect Dis**, v. 198, n. 1, p. 31-4, Jul 2008. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18471083> >.

JONES, C. A. et al. Population-based surveillance of neonatal herpes simplex virus infection in Australia, 1997-2011. **Clin Infect Dis**, v. 59, n. 4, p. 525-31, Aug 2014. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24846638> >.

JOVASEVIC, V.; LIANG, L.; ROIZMAN, B. Proteolytic cleavage of VP1-2 is required for release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus. **J Virol**, v. 82, n. 7, p. 3311-9, Apr 2008. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18216103> >.

JUHL, D. et al. Detection of herpes simplex virus DNA in plasma of patients with primary but not with recurrent infection: implications for transfusion medicine? **Transfus Med**, v. 20, n. 1, p. 38-47, Feb 2010. ISSN 1365-3148. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19708895> >.

KALU, E. I. et al. Sexual behavioral correlates with HSV-2 seroprevalence among pregnant women in Nigeria. **J Infect Dev Ctries**, v. 8, n. 8, p. 1006-12, Aug 2014. ISSN 1972-2680. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25116666> >.

KANG, S. H. et al. Safety of antiviral medication for the treatment of herpes during pregnancy. **Can Fam Physician**, v. 57, n. 4, p. 427-8, Apr 2011. ISSN 1715-5258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21490353> >.

KIMBERLIN, D. Herpes simplex virus, meningitis and encephalitis in neonates. **Herpes**, v. 11 Suppl 2, p. 65A-76A, Jun 2004. ISSN 0969-7667 (Print)

0969-7667 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15319092 >.

KIMBERLIN, D. W. Herpes simplex virus infections of the central nervous system. **Semin Pediatr Infect Dis**, v. 14, n. 2, p. 83-9, Apr 2003. ISSN 1045-1870 (Print)

1045-1870 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12881795 >.

_____. Neonatal herpes simplex infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 1, p. 1-13, Jan 2004. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14726453> >.

_____. Management of HSV encephalitis in adults and neonates: diagnosis, prognosis and treatment. **Herpes**, v. 14, n. 1, p. 11-6, Jun 2007. ISSN 0969-7667. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17848213> >.

KIMBERLIN, D. W. et al. Natural history of neonatal herpes simplex virus infections in the acyclovir era. **Pediatrics**, v. 108, n. 2, p. 223-9, Aug 2001. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483781> >.

KIMBERLIN, D. W.; WHITLEY, R. J. Neonatal herpes: what have we learned. **Semin Pediatr Infect Dis**, v. 16, n. 1, p. 7-16, Jan 2005. ISSN 1045-1870 (Print)

1045-1870 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15685144 >.

KNIPE, D. M.; CLIFFE, A. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 3, p. 211-21, Mar 2008. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18264117> >.

KUCERA, P. et al. Seroepidemiology of herpes simplex virus type 1 and 2 in pregnant women in Switzerland: an obstetric clinic based study. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 160, n. 1, p.

13-7, Jan 2012. ISSN 1872-7654. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21982938>>.

KUKHANOVA, M. K.; KOROVINA, A. N.; KOCHETKOV, S. N. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. **Biochemistry (Mosc)**, v. 79, n. 13, p. 1635-52, Dec 2014. ISSN 1608-3040. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25749169>>.

LAMERS, S. L. et al. Global Diversity within and between Human Herpesvirus 1 and 2 Glycoproteins. **J Virol**, v. 89, n. 16, p. 8206-18, Aug 2015. ISSN 1098-5514. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26018161>>.

LEGOFF, J.; PÉRE, H.; BÉLEC, L. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. **Viol J**, v. 11, p. 83, May 2014. ISSN 1743-422X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24885431>>.

LEUNG, D. Y. Why is eczema herpeticum unexpectedly rare? **Antiviral Res**, v. 98, n. 2, p. 153-7, May 2013. ISSN 1872-9096. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23439082>>.

LILJEQVIST, J. A.; TUNBÄCK, P.; NORBERG, P. Asymptomatically shed recombinant herpes simplex virus type 1 strains detected in saliva. **J Gen Virol**, v. 90, n. Pt 3, p. 559-66, Mar 2009. ISSN 0022-1317. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19218200>>.

LINDBERG, A.; KREIVI, J. P. Splicing inhibition at the level of spliceosome assembly in the presence of herpes simplex virus protein ICP27. **Virology**, v. 294, n. 1, p. 189-98, Mar 1 2002. ISSN 0042-6822 (Print)

0042-6822 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11886277>.

LIU, H. et al. Syphilis among middle-aged female sex workers in China: a three-site cross-sectional study. **BMJ Open**, v. 6, n. 5, p. e010420, May 2016. ISSN 2044-6055. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27165644>>.

LOOKER, K. J. et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0140765, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26510007>>.

_____. First estimates of the global and regional incidence of neonatal herpes infection. **Lancet Glob Health**, v. 5, n. 3, p. e300-e309, Mar 2017. ISSN 2214-109X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28153513>>.

_____. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e114989, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25608026>>.

LYONS, C. et al. Physical and sexual violence affecting female sex workers in Abidjan, Côte d'Ivoire: Prevalence, and the relationship between violence, the work environment, HIV and access to health services. **J Acquir Immune Defic Syndr**, Feb 2017. ISSN 1944-7884. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28169873> >.

MAJOR, C. A. et al. Expectant management of preterm premature rupture of membranes complicated by active recurrent genital herpes. **Am J Obstet Gynecol**, v. 188, n. 6, p. 1551-4; discussion 1554-5, Jun 2003. ISSN 0002-9378. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824992> >.

MARK, H. D. et al. Performance of focus ELISA tests for HSV-1 and HSV-2 antibodies among university students with no history of genital herpes. **Sex Transm Dis**, v. 34, n. 9, p. 681-5, Sep 2007. ISSN 0148-5717 (Print)

0148-5717 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17457239 >.

MATIS, J.; KÚDELOVÁ, M. Early shutoff of host protein synthesis in cells infected with herpes simplex viruses. **Acta Virol**, v. 45, n. 5-6, p. 269-77, 2001. ISSN 0001-723X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12083325> >.

MAYAUD, P. et al. Impact of acyclovir on genital and plasma HIV-1 RNA, genital herpes simplex virus type 2 DNA, and ulcer healing among HIV-1-infected African women with herpes ulcers: a randomized placebo-controlled trial. **J Infect Dis**, v. 200, n. 2, p. 216-26, Jul 2009. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19530940> >.

MCGEOCH, D. J.; RIXON, F. J.; DAVISON, A. J. Topics in herpesvirus genomics and evolution. **Virus Res**, v. 117, n. 1, p. 90-104, Apr 2006. ISSN 0168-1702 (Print)

0168-1702 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16490275 >.

MERRIGAN, M. B. et al. HIV Prevalence and Risk Behaviors Among Female Sex Workers in Botswana: Results from the 2012 HIV/STI Bio-Behavioral Study. **AIDS Behav**, v. 19, n. 5, p. 899-908, May 2015. ISSN 1573-3254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25074736> >.

MIRANDA, C. A. et al. Genital infection with herpes simplex virus types 1 and 2 in women from natal, Brazil. **ISRN Obstet Gynecol**, v. 2014, p. 323657, 2014. ISSN 2090-4436. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25006480> >.

MIRFAZAEIAN, H.; DANESHOD, Y. Herpes gladiatorum. **Emerg Med J**, v. 30, n. 11, p. 892, Nov 2013. ISSN 1472-0213. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23413153> >.

MITSUI, T. et al. Distinct changing profiles of hepatitis A and E virus infection among patients with acute hepatitis, patients on maintenance hemodialysis and healthy individuals in Japan. **J Med Virol**, v. 78, n. 8, p. 1015-24, Aug 2006. ISSN 0146-6615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16789007> >.

MOAYEDI-NIA, S. et al. HIV, HCV, HBV, HSV, and syphilis prevalence among female sex workers in Tehran, Iran, by using respondent-driven sampling. **AIDS Care**, v. 28, n. 4, p. 487-90, 2016. ISSN 1360-0451. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26565671> >.

MOCARSKI, E. S.; ROIZMAN, B. Structure and role of the herpes simplex virus DNA termini in inversion, circularization and generation of virion DNA. **Cell**, v. 31, n. 1, p. 89-97, Nov 1982. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6297756> >.

MUKOMOLOV, S. et al. Increased circulation of hepatitis A virus genotype IIIA over the last decade in St Petersburg, Russia. **J Med Virol**, v. 84, n. 10, p. 1528-34, Oct 2012. ISSN 1096-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22930498> >.

NAG, S. et al. Seroprevalence of Herpes Simplex Virus Infection in HIV Coinfected Individuals in Eastern India with Risk Factor Analysis. **Adv Virol**, v. 2015, p. 537939, 2015. ISSN 1687-8639. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26557849> >.

NAKUBULWA, S. et al. Association between HSV-2 and HIV serostatus in pregnant women of known HIV serostatus attending Mulago hospital antenatal clinic, Kampala, Uganda. **J Infect Dev Ctries**, v. 3, n. 10, p. 803-6, 2009. ISSN 1972-2680. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20009284> >.

NEWMAN, R. M. et al. Genome Sequencing and Analysis of Geographically Diverse Clinical Isolates of Herpes Simplex Virus 2. **J Virol**, v. 89, n. 16, p. 8219-32, Aug 2015. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26018166> >.

NICOLA, A. V.; MCEVOY, A. M.; STRAUS, S. E. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. **J Virol**, v. 77, n. 9, p. 5324-32, May 2003. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692234> >.

NIENABER, J. H. et al. Fulminant gestational hepatitis due to primary herpes simplex type 2 infection: use of serum HSV polymerase chain reaction for noninvasive diagnosis. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 72, n. 2, p. 181-4, Feb 2012. ISSN 1879-0070. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22104186> >.

NIU, M. T. et al. Two-year review of hepatitis A vaccine safety: data from the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS). **Clin Infect Dis**, v. 26, n. 6, p. 1475-6, Jun 1998. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9636890> >.

NORBERG, P. et al. Divergence and recombination of clinical herpes simplex virus type 2 isolates. **J Virol**, v. 81, n. 23, p. 13158-67, Dec 2007. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881457> >.

ODEGARD, J. M. et al. A novel HSV-2 subunit vaccine induces GLA-dependent CD4 and CD8 T cell responses and protective immunity in mice and guinea pigs. **Vaccine**, v. 34, n. 1, p. 101-9, Jan 2016. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26571309> >.

OKONKO, I. O.; COOKEY, T. I. Seropositivity and determinants of immunoglobulin-G (IgG) antibodies against Herpes simplex virus (HSV) types -1 and -2 in pregnant women in Port Harcourt, Nigeria. **Afr Health Sci**, v. 15, n. 3, p. 737-47, Sep 2015. ISSN 1729-0503. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26957960> >.

PATEL, R. et al. European guideline for the management of genital herpes, 2010. **Int J STD AIDS**, v. 22, n. 1, p. 1-10, Jan 2011. ISSN 1758-1052. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21364059> >.

PATTERSON, J. et al. Genital HSV detection among HIV-1-infected pregnant women in labor. **Infect Dis Obstet Gynecol**, v. 2011, p. 157680, 2011. ISSN 1098-0997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21527986> >.

PEREIRA, V. S. et al. Herpes simplex virus type 1 is the main cause of genital herpes in women of Natal, Brazil. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 161, n. 2, p. 190-3, Apr 2012. ISSN 1872-7654. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424592> >.

PERSE DA SILVA, A. et al. Genotypic Characterization of Herpes Simplex Virus Type 1 Isolates in Immunocompromised Patients in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0136825, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26407292> >.

PHIPPS, W. et al. Genital Herpes Simplex Virus Type 2 Shedding Among Adults With and Without HIV Infection in Uganda. **J Infect Dis**, v. 213, n. 3, p. 439-47, Feb 2016. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26486633> >.

PIRET, J.; GOYETTE, N.; BOIVIN, G. Novel Method Based on Real-Time Cell Analysis for Drug Susceptibility Testing of Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus. **J Clin Microbiol**, v. 54, n. 8, p. 2120-7, Aug 2016. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27252463> >.

PUHAKKA, L. et al. Decrease in seroprevalence for herpesviruses among pregnant women in Finland: cross-sectional study of three time points 1992, 2002 and 2012. **Infect Dis (Lond)**, v. 48, n. 5, p. 406-10, 2016. ISSN 2374-4243. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26654892> >.

QUINN, J. P.; DALZIEL, R. G.; NASH, A. A. Herpes virus latency in sensory ganglia--a comparison with endogenous neuronal gene expression. **Prog Neurobiol**, v. 60, n. 2, p. 167-79, Feb 2000. ISSN 0301-0082 (Print)

0301-0082 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10639053 >.

RADTKE, K. et al. Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 7, p. e1000991, 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20628567> >.

RAJTAR, B. et al. Antiviral effect of compounds derived from *Angelica archangelica* L. on Herpes simplex virus-1 and Coxsackievirus B3 infections. **Food Chem Toxicol**, May 2017. ISSN 1873-6351. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28487231> >.

RIANCHO, J. et al. Herpes simplex encephalitis: clinical presentation, neurological sequelae and new prognostic factors. Ten years of experience. **Neurol Sci**, v. 34, n. 10, p. 1879-81, Oct 2013. ISSN 1590-3478. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23780666> >.

ROBERTS, M. S. et al. Direct correlation between a negative autoregulatory response element at the cap site of the herpes simplex virus type 1 IE175 (alpha 4) promoter and a specific binding site for the IE175 (ICP4) protein. **J Virol**, v. 62, n. 11, p. 4307-20, Nov 1988. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2845144 >.

ROIZMAN, B.; ZHOU, G.; DU, T. Checkpoints in productive and latent infections with herpes simplex virus 1: conceptualization of the issues. **J Neurovirol**, v. 17, n. 6, p. 512-7, Dec 2011. ISSN 1538-2443. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052379> >.

RUSCH, M. L. et al. Distribution of sexually transmitted diseases and risk factors by work locations among female sex workers in Tijuana, Mexico. **Sex Transm Dis**, v. 37, n. 10, p. 608-14, Oct 2010. ISSN 1537-4521. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20585278> >.

SAMA, C. B. et al. Prevalence of maternal HIV infection and knowledge on mother-to-child transmission of HIV and its prevention among antenatal care attendees in a rural area in northwest Cameroon. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. e0172102, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28199373> >.

SANDBAUMHÜTER, M. et al. Cytosolic herpes simplex virus capsids not only require binding inner tegument protein pUL36 but also pUL37 for active transport prior to secondary envelopment. **Cell Microbiol**, v. 15, n. 2, p. 248-69, Feb 2013. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23186167> >.

SANDRI-GOLDIN, R. M.; MENDOZA, G. E. A herpesvirus regulatory protein appears to act post-transcriptionally by affecting mRNA processing. **Genes Dev**, v. 6, n. 5, p. 848-63, May 1992. ISSN 0890-9369 (Print)

0890-9369 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1315705>.

SAUERBREI, A. Herpes Genitalis: Diagnosis, Treatment and Prevention. **Geburtshilfe Frauenheilkd**, v. 76, n. 12, p. 1310-1317, Dec 2016. ISSN 0016-5751. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28017972>>.

SAUERBREI, A. et al. Database on natural polymorphisms and resistance-related non-synonymous mutations in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus types 1 and 2. **J Antimicrob Chemother**, v. 71, n. 1, p. 6-16, Jan 2016. ISSN 1460-2091. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26433780>>.

SCHIFFER, J. T. et al. Mathematical Modeling Predicts that Increased HSV-2 Shedding in HIV-1 Infected Persons Is Due to Poor Immunologic Control in Ganglia and Genital Mucosa. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0155124, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27285483>>.

SCHLOSS, L. et al. Monitoring of herpes simplex virus DNA types 1 and 2 viral load in cerebrospinal fluid by real-time PCR in patients with herpes simplex encephalitis. **J Med Virol**, v. 81, n. 8, p. 1432-7, Aug 2009. ISSN 1096-9071. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19551833>>.

SCHMIDT-CHANASIT, J. et al. A 12-year molecular survey of clinical herpes simplex virus type 2 isolates demonstrates the circulation of clade A and B strains in Germany. **J Clin Virol**, v. 48, n. 3, p. 208-11, Jul 2010. ISSN 1873-5967. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20488747>>.

SCHMUTZHARD, J. et al. Detection of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella-zoster virus in skin lesions. Comparison of real-time PCR, nested PCR and virus isolation. **J Clin Virol**, v. 29, n. 2, p. 120-6, Feb 2004. ISSN 1386-6532 (Print)

1386-6532 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14747031>.

SHEFFIELD, J. S. et al. Valacyclovir prophylaxis to prevent recurrent herpes at delivery: a randomized clinical trial. **Obstet Gynecol**, v. 108, n. 1, p. 141-7, Jul 2006. ISSN 0029-7844. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16816068>>.

SILVERMAN, J. G. et al. Sex trafficking and initiation-related violence, alcohol use, and HIV risk among HIV-infected female sex workers in Mumbai, India. **J Infect Dis**, v. 204 Suppl 5, p. S1229-

34, Dec 2011. ISSN 1537-6613. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22043037>>.

SIMPSON-HOLLEY, M. et al. Identification and functional evaluation of cellular and viral factors involved in the alteration of nuclear architecture during herpes simplex virus 1 infection. **J Virol**, v. 79, n. 20, p. 12840-51, Oct 2005. ISSN 0022-538X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16188986>>.

SMITH, C. A. et al. ICP4, the major transcriptional regulatory protein of herpes simplex virus type 1, forms a tripartite complex with TATA-binding protein and TFIIIB. **J Virol**, v. 67, n. 8, p. 4676-87, Aug 1993. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8392607>.

SMITH, P. D.; ROBERTS, C. M. American College Health Association annual Pap test and sexually transmitted infection survey: 2006. **J Am Coll Health**, v. 57, n. 4, p. 389-94, 2009 Jan-Feb 2009. ISSN 0744-8481. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19114378>>.

SOCÍAS, M. E. et al. Use of injectable hormonal contraception and HSV-2 acquisition in a cohort of female sex workers in Vancouver, Canada. **Sex Transm Infect**, Nov 2016. ISSN 1472-3263. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27821613>>.

SPEAR, P. G. et al. Heparan sulfate glycosaminoglycans as primary cell surface receptors for herpes simplex virus. **Adv Exp Med Biol**, v. 313, p. 341-53, 1992. ISSN 0065-2598. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1332443>>.

STANFIELD, B. A. et al. Vaccination of rhesus macaques with the live-attenuated HSV-1 vaccine VC2 stimulates the proliferation of mucosal T cells and germinal center responses resulting in sustained production of highly neutralizing antibodies. **Vaccine**, v. 35, n. 4, p. 536-543, Jan 2017. ISSN 1873-2518. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28017425>>.

STAPLETON, J. T.; LEMON, S. M. Neutralization escape mutants define a dominant immunogenic neutralization site on hepatitis A virus. **J Virol**, v. 61, n. 2, p. 491-8, Feb 1987. ISSN 0022-538X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2433464>>.

STRICK, L. B.; WALD, A.; CELUM, C. Management of herpes simplex virus type 2 infection in HIV type 1-infected persons. **Clin Infect Dis**, v. 43, n. 3, p. 347-56, Aug 2006. ISSN 1537-6591. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16804851>>.

SUAZO, P. A. et al. Herpes simplex virus 2 infection: molecular association with HIV and novel microbicides to prevent disease. **Med Microbiol Immunol**, v. 204, n. 2, p. 161-76, Apr 2015. ISSN 1432-1831. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25209142>>.

SZPARA, M. L. et al. Evolution and diversity in human herpes simplex virus genomes. **J Virol**, v. 88, n. 2, p. 1209-27, Jan 2014. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24227835> >.

TANG, J. W. et al. Viral loads of herpes simplex virus in clinical samples--a 5-year retrospective analysis. **J Med Virol**, v. 82, n. 11, p. 1911-6, Nov 2010. ISSN 1096-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20872718> >.

TAVAKOLI, A. et al. Asymptomatic Herpes Simplex Virus Infection in Iranian Mothers and Their Newborns. **Fetal Pediatr Pathol**, v. 36, n. 1, p. 27-32, Feb 2017. ISSN 1551-3823. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27762667> >.

THIRY, E. et al. Recombination in alphaherpesviruses. **Rev Med Virol**, v. 15, n. 2, p. 89-103, 2005 Mar-Apr 2005. ISSN 1052-9276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546129> >.

TRANI, F. et al. Female sex street workers and sexually transmitted infections: their knowledge and behaviour in Italy. **J Infect**, v. 52, n. 4, p. 269-75, Apr 2006. ISSN 1532-2742. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16061288> >.

TRONSTEIN, E. et al. Genital shedding of herpes simplex virus among symptomatic and asymptomatic persons with HSV-2 infection. **JAMA**, v. 305, n. 14, p. 1441-9, Apr 2011. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21486977> >.

USTAÇELEBI, S. Diagnosis of herpes simplex virus infections. **J Clin Virol**, v. 21, n. 3, p. 255-9, Jun 2001. ISSN 1386-6532. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11397662> >.

VAN DE PERRE, P. et al. Herpes simplex virus and HIV-1: deciphering viral synergy. **Lancet Infect Dis**, v. 8, n. 8, p. 490-7, Aug 2008. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18652995> >.

VAN ROOIJEN, M. S. et al. False-negative type-specific glycoprotein G antibody responses in STI clinic patients with recurrent HSV-1 or HSV-2 DNA positive genital herpes, The Netherlands. **Sex Transm Infect**, v. 92, n. 4, p. 257-60, Jun 2016. ISSN 1472-3263. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26755775> >.

WAGSTAFF, A. J.; FAULDS, D.; GOA, K. L. Aciclovir. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 47, n. 1, p. 153-205, Jan 1994. ISSN 0012-6667. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7510619> >.

WALD, A.; ASHLEY-MORROW, R. Serological testing for herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 infection. **Clin Infect Dis**, v. 35, n. Suppl 2, p. S173-82, Oct 2002. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12353203> >.

WALD, A. et al. Polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus (HSV) DNA on mucosal surfaces: comparison with HSV isolation in cell culture. **J Infect Dis**, v. 188, n. 9, p. 1345-51, Nov 2003. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14593592> >.

WANG, H. B. et al. Prevalence, incidence, and persistence of syphilis infection in female sex workers in a Chinese province. **Epidemiol Infect**, v. 139, n. 9, p. 1401-9, Sep 2011. ISSN 1469-4409. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21073767> >.

WANG, J. J. et al. Herpes simplex virus type 2 risks in female sex workers in the China-Vietnam border county of Hekou. **Biomed Environ Sci**, v. 25, n. 6, p. 706-10, Dec 2012. ISSN 0895-3988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23228841> >.

WANG, K. et al. A Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2) gD Mutant Impaired for Neural Tropism Is Superior to an HSV-2 gD Subunit Vaccine To Protect Animals from Challenge with HSV-2. **J Virol**, v. 90, n. 1, p. 562-74, Nov 2015. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26559846> >.

WHITLEY, R.; DAVIS, E. A.; SUPPAPANYA, N. Incidence of neonatal herpes simplex virus infections in a managed-care population. **Sex Transm Dis**, v. 34, n. 9, p. 704-8, Sep 2007. ISSN 0148-5717. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17413535> >.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **Lancet**, v. 357, n. 9267, p. 1513-8, May 2001. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11377626> >.

WONG, A. A. et al. Development of a multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of herpes simplex and varicella zoster viruses in cerebrospinal fluid and lesion swab specimens. **J Virol Methods**, v. 229, p. 16-23, Mar 2016. ISSN 1879-0984. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26711555> >.

WORKOWSKI, K. A.; BOLAN, G. A.; PREVENTION, C. F. D. C. A. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. **MMWR Recomm Rep**, v. 64, n. RR-03, p. 1-137, Jun 2015. ISSN 1545-8601. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26042815> >.

XIMENES, R. A. et al. Methodology of a nationwide cross-sectional survey of prevalence and epidemiological patterns of hepatitis A, B and C infection in Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 26, n. 9, p. 1693-704, Sep 2010. ISSN 1678-4464. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20877930> >.

YANG, Y. et al. Herpes simplex virus type 2 infection among female sex workers in Shanghai, China. **AIDS Care**, v. 23 Suppl 1, p. 37-44, Jun 2011. ISSN 1360-0451. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21660749> >.

ZHANG, X. et al. Targeting the genital tract mucosa with a lipopeptide/recombinant adenovirus prime/boost vaccine induces potent and long-lasting CD8+ T cell immunity against herpes: importance of MyD88. **J Immunol**, v. 189, n. 9, p. 4496-509, Nov 2012. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23018456> >.

ZUCCOLA, H. J. et al. The crystal structure of an unusual processivity factor, herpes simplex virus UL42, bound to the C terminus of its cognate polymerase. **Mol Cell**, v. 5, n. 2, p. 267-78, Feb 2000. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10882068> >.

8) ANEXOS



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Epidemiologia e caracterização genotípica dos herpesvirus em adultos, crianças e adolescentes

Pesquisador: Vanessa Salet de Paula

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 26183314.7.0000.5248

Instituição Proponente: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 895.159

Data da Relatoria: 15/12/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda proposta pela Pesquisadora Principal, na qual justifica, que devido à escassez de dados sobre as Infecções causadas pelos vírus herpes simples no Brasil, o seu grupo decidiu ampliar a população estudada, em relação ao projeto anterior.

Esta emenda tem por objetivo, gerar dados epidemiológicos concisos e imediatos de uma população diversificada e não apenas em gestantes.

Desta forma, foi incluído ao trabalho a população masculina e mulheres (gestantes e não gestantes), portadores ou não de outras DSTs, a fim de levantar dados em diferentes grupos da população.

Essa inclusão possibilitará ao grupo estudar as co-infecções do HSV com outros patógenos causadores de DSTs, principalmente com o HIV, o que é de grande relevância científica, já que pacientes HIV positivos apresentam uma maior probabilidade de reativação da infecção latente causada pelos vírus herpes simples.

Desta forma, o trabalho poderá contribuir com dados de prevalência e de epidemiologia molecular do HSV, além de possibilitar a detecção de cepas resistentes ao aciclovir nesta população, o que interfere diretamente na escolha do tratamento. Para que o objetivo da Emenda fosse alcançado, novas colaborações foram estabelecidas (UFF e o HGNI).

Continuação do Parecer: 095/109

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar a epidemiologia molecular dos herpesvirus em adultos, crianças e adolescentes.

Objetivos Secundários:

- 1- Determinar o estado sorológico da população estudada; Caracterizar molecularmente as cepas de HSV-1/2 prevalentes nos diferentes grupos;
- 2- Investigar a existência de cepas recombinantes dentre os isolados obtidos;
- 3- Identificar mutações que conferem resistências ao aciclovir nos isolados obtidos;
- 4- Comparar as sequências encontradas com sequências já descritas anteriormente no Genbank;
- 5- Realizar transferência tecnológica de protocolos de biologia molecular (diagnóstico de infecção por vírus da família Herpesviridae;
- 6- Detectar o perfil de resistência por HSV-1 e 2 para o Departamento de Patologia Clínica do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O paciente apresenta como risco à participação da pesquisa: o risco moral, expresso pelo constrangimento do diagnóstico de infecção pelo(s) vírus herpes.

Benefícios:

O participante da pesquisa terá como benefício direto a obtenção do diagnóstico de resistência ao aciclovir. Caso, a resistência seja detectada caberá ao médico responsável, a decisão sobre o tratamento adequado à aquele paciente, caso este apresente ou venha a apresentar uma infecção sintomática.

Este trabalho tem também como benefício o possível esclarecimento problemas relacionados à epidemiologia dos vírus herpes simples na população estudada. Como benefício para o Instituto da Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente será realizado a transferência tecnológica de protocolos de biologia molecular (diagnóstico de infecção por vírus da família Herpesviridae e detecção de perfil de resistência por HSV-1 e 2).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A Emenda é relevante e viável para a proposta apresentada pelo Projeto. Já anteriormente aprovado pelo CEP-IOC.



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 095.159

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos foram apresentados segundo as normativas Institucionais e Ministeriais.

Recomendações:

Recomendo que a proposta de emenda ao Projeto seja aprovada "Ad referendum", visto estar atendendo as prerrogativas legais, e visando agilizar o início da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Projeto e o pedido de emenda encontram-se adequados e sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP Fiocruz/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Res.CNS 466/12, manifesta-se por APROVAR, Ad-Referendum, a Emenda proposta pela pesquisadora principal na forma como foi apresentada.

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deverá ser submetida a apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Epidemiologia e caracterização genotípica dos herpesvirus em adultos, crianças e adolescentes

Pesquisador: Vanessa Saete de Paula

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 28183314.7.3002.5254

Instituição Proponente: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 966.966

Data da Relatoria: 17/12/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda proposta pela Pesquisadora Principal, na qual justifica, que devido à escassez de dados sobre as infecções causadas pelos vírus herpes simples no Brasil, o seu grupo decidiu ampliar a população estudada, em relação ao projeto anterior. Esta emenda tem por objetivo, gerar dados epidemiológicos concisos e imediatos de uma população diversificada e não apenas em gestantes. Desta forma, foi incluído ao trabalho a população masculina e mulheres (gestantes e não gestantes), portadores ou não de outras DSTs, a fim de levantar dados em diferentes grupos da população. Essa inclusão possibilitará ao grupo estudar as co-infecções do HSV com outros patógenos causadores de DSTs, principalmente com o HIV, o que é de grande relevância científica, já que pacientes HIV positivos apresentam uma maior probabilidade de reativação da infecção latente causada pelos vírus herpes simples. Desta forma, o trabalho poderá contribuir com dados de prevalência e de epidemiologia molecular do HSV, além de possibilitar a detecção de cepas resistentes ao aciclovir nesta população, o que interfere diretamente na escolha do tratamento. Para que o objetivo da Emenda fosse alcançado, novas colaborações foram estabelecidas (UFF e o HGNI).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Continuação do Parecer: 900.900

Caracterizar a epidemiologia molecular dos herpesvirus em adultos, crianças e adolescentes.

Objetivos Secundários:

- 1- Determinar o estado sorológico da população estudada; caracterizar molecularmente as cepas de HSV-1/2 prevalentes nos diferentes grupos;
- 2- Investigar a existência de cepas recombinantes dentre os isolados obtidos;
- 3- Identificar mutações que conferem resistências ao aciclovir nos isolados obtidos;
- 4- Comparar as sequências encontradas com sequências já descritas anteriormente no Genbank;
- 5- Realizar transferência tecnológica de protocolos de biologia molecular (diagnóstico de infecção por vírus da família Herpesviridae);
- 6- Detectar o perfil de resistência por HSV-1 e 2 para o Departamento de Patologia Clínica do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O paciente apresenta como risco à participação da pesquisa: o risco moral, expresso pelo constrangimento do diagnóstico de infecção pelo(s) vírus herpes.

Benefícios:

O participante da pesquisa terá como benefício direto a obtenção do diagnóstico de resistência ao aciclovir. Caso, a resistência seja detectada caberá ao médico responsável, a decisão sobre o tratamento adequado a aquele paciente, caso este apresente ou venha a apresentar uma infecção sintomática. Este trabalho tem também como benefício o possível esclarecimento de problemas relacionados à epidemiologia dos vírus herpes simples na população estudada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está suficientemente claro em seus propósitos e devidamente fundamentado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados a folha de rosto, projeto de pesquisa, cronograma atualizado, orçamento da pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido.

Recomendações:

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP HGNI

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Geral de Nova Iguaçu (CEP HGNI), em sua Reunião Ordinária, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

NOVA IGUAÇU, 27 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
Luis Henrique de Oliveira Claro
(Coordenador)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Epidemiologia e caracterização genotípica dos herpesvirus em adultos, crianças e adolescentes

Pesquisador: Vanessa Saete de Paula

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 28183314.7.3001.5269

Instituição Proponente: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 918.560

Data da Relatoria: 03/12/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda proposta pela Pesquisadora Principal, na qual justifica, que devido à escassez de dados sobre as Infecções causadas pelos vírus herpes simples no Brasil, o seu grupo decidiu ampliar a população estudada, em relação ao projeto anterior. Esta emenda tem por objetivo, gerar dados epidemiológicos concisos e imediatos de uma população

diversificada e não apenas em gestantes. Desta forma, foi incluído ao trabalho a população masculina e mulheres (gestantes e não gestantes), portadores ou não de outras DSTs, a fim de levantar dados em diferentes grupos da população.

Essa inclusão possibilitará ao grupo estudar as co-infecções do HSV com outros patógenos causadores de DSTs, principalmente com o HIV, o que é de grande relevância científica, já que pacientes HIV positivos apresentam uma maior probabilidade de reativação da infecção latente causada pelos vírus herpes simples. Desta forma, o trabalho poderá contribuir com dados de prevalência e de epidemiologia molecular do HSV, além de possibilitar a detecção de cepas resistentes ao aciclovir nesta população, o que interfere diretamente na escolha do tratamento. Para que o objetivo da Emenda fosse alcançado, novas colaborações foram estabelecidas (UFF e o HGNI).

Continuação do Parecer: 910.560

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar a epidemiologia molecular dos herpesvírus em adultos, crianças e adolescentes

Objetivo Secundário:

Determinar o estado sorológico da população estudada; Caracterizar molecularmente as cepas de HSV-1/2 prevalentes nos diferentes grupos; Investigar a existência de cepas recombinantes dentre os isolados obtidos; Identificar mutações que conferem resistências ao aciclovir nos isolados obtidos; Comparar as sequências encontradas com sequências já descritas anteriormente no Genbank; Realizar transferência tecnológica de protocolos de biologia molecular (diagnóstico de infecção por vírus da família Herpesviridae e detecção de perfil de resistência por HSV-1 e 2) para o

Departamento de Patologia Clínica do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O paciente apresenta como risco a participação da pesquisa: o risco moral, expresso pelo constrangimento do diagnóstico de infecção pelo(s) vírus herpes.

Benefícios:

O participante da pesquisa terá como benefício direto a obtenção do diagnóstico de resistência ao aciclovir. Caso, a resistência seja detectada caberá ao médico responsável, a decisão sobre o tratamento adequado a aquele paciente, caso este apresente ou venha a apresentar uma infecção sintomática.

Este trabalho tem também como benefício o possível esclarecimento de problemas relacionados a epidemiologia dos vírus herpes simples na população estudada. Como benefício para o Instituto da Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente será realizado a transferência tecnológica de protocolos de biologia molecular (diagnóstico de infecção por vírus da família Herpesviridae e detecção de perfil de resistência por HSV-1 e 2).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A Emenda é relevante e viável para a proposta apresentada pelo Projeto. Já anteriormente aprovado pelo CEP-IOC.

Continuação do Parecer: 910.560

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A apresentação de autorização da Vice-Direção de Pesquisa do IFF (Sra. Kátia Sydrônio), é essencial para a realização do projeto no IFF

Recomendações:

- O TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO SOMENTE PODERÁ SER UTILIZADO APÓS SER CARIMBADO, DATADO E ASSINADO PELO CEPIFF
- OBSERVAR AS RECOMENDAÇÕES DA RESOLUÇÃO 466/12
- COMUNICAR AO CEPIFF O INICIO E ENCERRAMENTO DO PROJETO EM NOTIFICAÇÃO
- É OBRIGATÓRIO APRESENTAR OS RELATORIOS SEMESTRAIS E FINAIS ATRAVÉS DA NOTIFICAÇÃO NA PLATAFORMA BRASIL
- ATUALIZAR O CRONOGRAMA DO PROJETO
- APRESENTAR AO CEP DO IFF A CARTA DE AUTORIZAÇÃO DA VICE DIRETORIA DE PESQUISA DO IFF PARA A REALIZAÇÃO DO PROJETO NO IFF. O PROJETO SÓ PODERÁ TER INÍCIO APÓS A APRESENTAÇÃO DO REFERIDO DOCUMENTO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

OBSERVAR E ATENDER AS RECOMENDAÇÕES

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 17 de Dezembro de 2014

Assinado por:
maria elisabeth lopes moreira
(Coordenador)