

# Vírus da varicela-zoster: identificação dos genótipos em casos de varicela e herpes-zoster nos Municípios de Ananindeua, Belém e Marituba, Estado do Pará, Brasil

Varicella-zoster virus: identification of genotypes in cases of varicella and herpes zoster in the Municipalities of Ananindeua, Belém and Marituba, Pará State, Brazil

Virus de la varicela zóster: identificación de los genotipos en casos de varicela y herpes zóster en los Municipios de Ananindeua, Belém y Marituba, Estado de Pará, Brasil

Marcos Rogério Menezes da Costa  
Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém,  
Pará, Brasil  
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,  
Pará, Brasil

Talita Antônia Furtado Monteiro  
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,  
Pará, Brasil

Alexandre da Costa Linhares  
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,  
Pará, Brasil

Igor Brasil Costa  
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,  
Pará, Brasil

Jane Haruko Lima Kaiano  
Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém,  
Pará, Brasil  
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,  
Pará, Brasil

Darleise de Souza Oliveira  
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,  
Pará, Brasil

Francisco Lúzio de Paula Ramos  
Seção de Bacteriologia e Micologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS,  
Ananindeua, Pará, Brasil

Rita Catarina Medeiros de Sousa  
Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém,  
Pará, Brasil  
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,  
Pará, Brasil

## RESUMO

Este é um estudo do tipo transversal, em que o critério clínico para inclusão das amostras foi a suspeita clínica e/ou aparecimento dos sintomas da varicela ou herpes-zoster para identificação dos genótipos do vírus da varicela-zoster (VVZ), por meio das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento, com posterior pesquisa de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). De novembro de 2008 a março de 2012, foram coletadas 93 amostras (85 casos de varicela e oito de herpes-zoster) de swab nasal, oral e de secreção de vesículas rompidas em vários sítios anatômicos (49 de indivíduos do sexo masculino e 44 do feminino). As estirpes Dumas e Oka parental foram incluídas como referência padrão dos genótipos europeu (classe 1 ou 3) e japonês (classe 2), respectivamente. Estirpes com variabilidade no SNP foram classificadas dentro de um grupo de genótipo denominado mosaico (classe 5). As classes 1 ou 3 foram identificadas em 11 amostras do VVZ, nove casos de varicela e dois casos de herpes-zoster, enquanto que duas amostras apresentaram o genótipo de classe 5, ambos casos de varicela. O genótipo classe 1 ou 3 foi encontrado nos Municípios de Ananindeua, Belém e Marituba, Estado do Pará, Brasil, sendo que o genótipo classe 5 apenas em Ananindeua. A PCR foi sensível em 13 amostras de material direto de vesículas, enquanto que em amostras de saliva não se obteve sucesso.

**Palavras-chave:** Vírus da varicela-zoster; Varicela; Herpes-zoster; Genótipos; Reação em Cadeia da Polimerase; Polimorfismos de Nucleotídeo Único.

## INTRODUÇÃO

O herpesvírus humano-3 (HHV-3), também conhecido como vírus da varicela-zoster (VVZ) da

subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*, apresenta como principal característica a capacidade de estabelecer latência. A partícula intacta do VVZ mede de 180–200 nm de diâmetro, com genoma linear de DNA dupla fita de 125 kb, que está contido em um cerne de 75 nm dentro de um nucleocapsídeo. Assim como outros herpesvírus, o VVZ tem regiões únicas longas e curtas, uma região de repetição terminal (TR) e outra invertida (IR), dentro das quais se encontram os genes duplicados, além das regiões internas de repetições R1 a R5<sup>1,2</sup>.

### Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Marcos Rogério Menezes da Costa  
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS  
Rodovia BR-316 km 7, s/n. Bairro: Levilândia  
CEP: 67030-000 Ananindeua-Pará-Brasil  
Tel.: +55 (91) 3214-2017 / 3246-1580  
E-mail: marcos.rmcosta@gmail.com

O VZ pode causar varicela (catapora) durante a infecção primária, estabelecendo posteriormente uma infecção latente. Em diversas situações em que ocorre um declínio da imunidade celular específica contra o VZV pode ocorrer reativação da replicação viral, com possibilidade de manifestação clínica por meio do herpes-zoster<sup>3</sup>. A vacina com o VZV atenuado estirpe Oka/Merck, licenciada nos Estados Unidos da América (EUA), quando aplicada em duas doses com diferença de três meses, apresenta 85% de eficácia na prevenção contra a varicela e 95% contra doença grave que requer terapia antiviral, sendo bastante segura e bem tolerada por crianças saudáveis. Eventos adversos, tais como herpes-zoster pós-vacinal, são raros e ocorrem na maioria dos casos em imunocomprometidos<sup>4</sup>.

Para distinguir a estirpe Oka (utilizada em vacinas) do tipo "selvagem" de VZV, diversos estudos combinaram as técnicas de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e reação em cadeia da polimerase (PCR) para produzir métodos laboratoriais com relativo grau de sucesso para uso na rotina. Esses métodos evidenciam a divergência genética nas ORF38 e ORF54 do genoma viral, as quais têm como produto, respectivamente, as seguintes glicoproteínas (gp): gp40, uma proteína tegumentar que interage com os microtúbulos da célula na formação da partícula viral e gp55, uma proteína tegumentar estrutural denominada de proteína portal do capsídeo<sup>5,6,7,8,9</sup>.

Por meio de técnicas de PCR e RFLP, duas regiões clivadas por enzimas de restrição correspondentes a polimorfismos em polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* – SNP) do VZV têm funcionado como poderosa referência pontual para caracterização epidemiológica e geográfica das variações das estirpes<sup>10</sup>. SNPs são regiões que contêm variações únicas de pares de bases<sup>10</sup>. No caso do VZV, a partir de 2000, seus SNPs foram caracterizados a partir de metodologias de genotipagem publicadas por dois grupos, um norte-americano e outro inglês<sup>11,12,13,14</sup>.

As duas metodologias de SNP baseadas em genotipagem diferem em suas abordagens. O método de SNP disperso, desenvolvido pelo Grupo de Breuer, no Reino Unido, baseia-se em ensaios de mobilidade heteroduplex para identificar 92 polimorfismos em 37 ORFs distribuídos uniformemente pelo genoma do VZV. Esse grupo de pesquisa identificou três genótipos filogeneticamente distintos circulando no Reino Unido e um quarto no Japão<sup>2,11,14</sup>.

O grupo norte-americano (Universidade de Iowa, Iowa, EUA), liderada por Grose, sequenciou cinco genes

de glicoproteínas, dentre esses a ORF que codifica a maior proteína de transativação imediata (IE62)<sup>15</sup>. Sessenta e um polimorfismos, 21 nas glicoproteínas e 40 na ORF62, foram identificados<sup>12</sup>. A análise filogenética dessas regiões identificou quatro classes<sup>16</sup>.

Um terceiro grupo de pesquisa, liderado por Schmid no Centers for Disease Control and Prevention (CDC), localizou um fragmento de 447 pb na ORF22, região denominada de "up stream" C-terminal, o qual foi suficientemente polimórfico para permitir a identificação de quatro subtipos virais<sup>13</sup>. Loparev et al<sup>13</sup> analisaram variações genotípicas utilizando um fragmento de 447 pb da região ORF22 (especificamente as posições nucleotídicas 37902, 38055, 38081, 38177 e 38229), que tem como produto a gp24, uma grande proteína estrutural que faz parte do tegumento viral, com localização subcelular no virion<sup>1,13</sup>. A diversidade nucleotídica desta sequência foi usada para definir o genótipo de 326 isolados de VZV de amostras de cinco continentes<sup>13</sup>.

O uso das endonucleases de restrição *PstI* e *BglI*, permitiu identificar os sítios de clivagem para estas enzimas na ORF38 e ORF54, respectivamente. Diversas estirpes isoladas nos EUA contêm um sítio de restrição da enzima *PstI* na região ORF38, onde ocorre uma troca do nucleotídeo guanina (G) por adenina (A) na posição 69349 que a estirpe Oka vacinal não possui<sup>5</sup>. Além disso, uma troca do nucleotídeo citosina (C) por timina (T) na posição 95241 resulta na eliminação do sítio de restrição da enzima *BglI*, localizada na ORF54, a qual é encontrada em todas as estirpes japonesas e que está ausente em muitos isolados dos EUA<sup>6,7,8,9</sup>. Dessa maneira, as estirpes japonesas podem apresentar os genótipos *PstI*<sup>+</sup> *BglI*<sup>+</sup> ou *PstI*<sup>-</sup> *BglI*<sup>+</sup>, enquanto muitos VZV isolados nos EUA são *PstI*<sup>+</sup> *BglI*<sup>-6,7,8,9</sup>.

Em 2007, a análise dessas três ORFs permitiu a classificação dos genótipos do VZV por distribuição geográfica em: europeu (E), japonês (J) e mosaico (M)<sup>17</sup>.

Ao todo, esses três grupos de pesquisa identificaram cinco subtipos virais distintos, embora nenhum grupo tenha identificado todos os cinco. De acordo com a conferência VZV Nomenclature Meeting 2008<sup>2</sup>, realizada em 25 de julho de 2008 em Whitechapel, Londres, Reino Unido, as cepas de VZV detectadas e caracterizadas por sequenciamento dos SNPs seriam agrupadas em classes de 1 a 5, em substituição aos genótipos preconizados na classificação do CDC. As diferentes nomenclaturas utilizadas por cada grupo são apresentadas no quadro 1.

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

Fonte: Adaptado de Breuer et al<sup>2</sup>, 2010.

**Quadro 1** – Nomenclatura genotípica do VZV utilizada atualmente

Loparev et al<sup>18</sup> identificaram SNPs que discriminam os genótipos E1 e E2 nas ORF21, ORF22 [região 2], e ORF50. Análise de SNP em qualquer destas regiões é suficiente para discriminar cepas E1 de outras europeias. Duas posições adicionais em ORF38 (69349) e ORF54 (95241), originalmente usadas para confirmar os eventos adversos da vacina Oka, também fornecem informações para genotipagem. Esses dois marcadores não são úteis para vacina Oka especificamente, mas servem para distinguir algumas cepas J, M1, M2 e M4<sup>19</sup> de outros genótipos. Um subconjunto de isolados de genótipo J (por exemplo, pOka, que foi a fonte para a vacina de vírus Oka) contém um sítio de restrição *Pst*I na ORF38 e ORF54 incluindo a sequência de um local de restrição *Bgl*II comum a genótipos J, M1, M2 e M4<sup>2,13</sup>.

O genótipo E foi identificado em cepas obtidas de pacientes da Alemanha, Islândia, República Tcheca, Polônia, Rússia europeia, Bielorrússia, Ucrânia, Lituânia, Letônia, Moldávia e Estônia<sup>13,20</sup>. Esse genótipo também foi o mais prevalente na Ásia, Rússia, Cazaquistão, leste da Austrália, Canadá, Estados Unidos, Jordânia, Chile e Nicarágua, mostrando-se altamente cosmopolita. Com base na análise dos isolados obtidos a partir de vários locais geográficos distintos, o genótipo E mostrou um grupo de bases conservadoras no perfil dos SNPs da ORF22 e todas as cepas E também apresentaram o padrão de marcador *Pst*I *Bgl*II. Uma observação surpreendente foi a descoberta do domínio geográfico de cepas do genótipo M em áreas tropicais e subtropicais, como a África (Congo, República do Tchad, Marrocos e Guiné-Bissau) e na Ásia (Índia, Bangladesh, Nepal e China)<sup>13,21</sup>.

Além das cepas J comuns no Japão, Austrália e alguns países do leste asiático, os padrões *Bgl*I<sup>+</sup> também são comumente isolados em climas tropicais (por exemplo, na África equatorial, Índia, Bangladesh, no sul da China, América Central e norte da Austrália). Em contraste, vírus *Bgl*I<sup>-</sup> são comuns em climas temperados. Dois isolados *Pst*I<sup>-</sup> *Bgl*I<sup>-</sup> também foram observados na Austrália<sup>13,18,19,22</sup>. Assim, para dominância geográfica, foram observados os genótipos E1 e E2 (Europa), M1 (África) e J (Japão). O predomínio de cepas genótipo E na América do Norte e Austrália provavelmente foi estabelecido durante a colonização europeia nos séculos XVI e XVII. Mudanças relativamente recentes na imigração e/ou padrões de viagens internacionais para certas regiões geográficas (principalmente Europa, Austrália e Estados Unidos) têm ocasionado a cocirculação de uma variedade de genótipos de VVZ<sup>13,17,19,20,23,24,25,26,27</sup>.

Um genótipo proposto como recombinante do VVZ de amostras do Brasil foi classificado como uma estirpe do genótipo M<sup>19</sup>. De dez isolados obtidos de forma independente no Brasil, oito estirpes tipo M e dois do genótipo E tinham padrões de SNP semelhantes aos descritos por Barrett-Muir et al<sup>13,28</sup>.

No Brasil, a maior parte dos estudos envolvendo varicela e herpes-zoster considera apenas os aspectos sintomatológicos<sup>29,30,31,32,33</sup>. Assim sendo, este estudo teve por objetivo permitir o conhecimento de estirpes

circulantes do VVZ na região metropolitana de Belém, Estado do Pará, Brasil e disponibilizar informações importantes de identificação e distribuição dos genótipos do VVZ, nas diversas faixas etárias investigadas e/ou associação desses à determinada patologia.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### ÁREA DE ESTUDO

As amostras para este estudo foram obtidas nos Municípios de Ananindeua, Belém e Marituba, localizados na região metropolitana de Belém, Estado do Pará.

### POPULAÇÃO DO ESTUDO

Estudo do tipo transversal em que o critério clínico para inclusão das amostras foi a suspeita clínica e/ou aparecimento dos sintomas de varicela ou herpes-zoster. Durante o período de novembro de 2008 a março de 2012, foram coletadas 93 amostras de swab nasal/oral (49 de indivíduos do gênero masculino e 44 do feminino). Desses 93 indivíduos, 26 (13 de indivíduos do gênero masculino e 13 do feminino) apresentavam vesículas rompidas, das quais foram coletados swab. Todas as amostras, oriundas de pacientes procedentes das redes pública e privada de saúde, foram coletadas no Instituto Evandro Chagas (IEC), localizado em Ananindeua, Estado do Pará.

### IDENTIFICAÇÃO, PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

A coleta das amostras foi realizada em 93 indivíduos (85 casos de varicela e oito de herpes-zoster), sendo 93 amostras de swab nasal/oral e 26 amostras (22 casos de varicela e quatro de herpes-zoster) de secreção de vesículas rompidas em vários sítios anatômicos. As amostras foram identificadas e coletadas no dia do atendimento e encaminhadas para a Seção de Virologia do IEC. O período de coleta das amostras foi definido entre o primeiro até 12º dia após o início dos sintomas.

Na etapa de processamento, sem extração de ácidos nucleicos e utilização direta do material clínico para etapa de amplificação, as amostras de swab nasal, oral e vesículas foram mergulhadas, cada uma, em um microtubo contendo 100 µL de água destilada e esterilizada, sendo o swab lavado em 400 µL do mesmo tipo de água, pressionando-o contra a parede do tubo para retirar o máximo de partículas virais e, após esta etapa, a suspensão foi armazenada a -70º C<sup>34</sup>.

### AMPLIFICAÇÃO DO DNA VIRAL POR PCR

As estirpes Dumas e Oka parental foram incluídas como referência padrão dos genótipos E (classes 1 ou 3) e J (classe 2), respectivamente. As estirpes foram classificadas nas classes de 1, 2 ou 3 quando exibiram os SNPs de um dos dois genótipos. Algumas estirpes apresentaram variabilidades nessas sequências e foram classificadas dentro do grupo de genótipo M (classes 4 ou 5)<sup>2,13</sup>.

Após o processamento das amostras de swab nasal, oral e/ou de vesículas, o material foi utilizado diretamente na PCR. Amostras de células diploides humanas HEp-2

(carcinoma epidermoide humano) foram usadas como controle negativo, enquanto que uma amostra comercial da vacina Varicela Biken® (Sanofi Pasteur, Suita, Osaka, Japão), estirpe vOka, foi utilizada como controle positivo para identificação das ORFs 22, 38 e 54.

A reação de amplificação de um fragmento de 447 pb da região ORF22 foi realizada em termociclador Gene Amp PCR System 9600 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) com os oligonucleotídeos p22R1f 5'-GGGTTTTGTATGAGCGTTGG-3' e p22R1r 5'-CCCCGAGGTTTCGTAATATC-3'; para amplificação de 350 pb da região ORF38 foram utilizados os oligonucleotídeos PstA 5'-TTGAACAATCACGAACCGTT-3' e PstB 5'-CGGGTGAACCGTATTCTGAG-3'; e para amplificação de 222 pb da ORF54 foram utilizados os oligonucleotídeos Nla 5'-GGAACCCCTGCACCATTA-3' e Fok 5'-TCCCTTCATGCCCGTTACAT-3'<sup>10</sup>.

As mesmas condições de reação de PCR foram adotadas para essas duas regiões com volume final de 50 µL, usando AmpliTaq Gold PCR Master Mix (0,025 U da enzima GoldTaq DNA polimerase, tampão II 1X para PCR, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato [Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA]), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, e 5 µL da amostra. Cada etapa incluiu um aquecimento inicial de 96° C por 5 min para ativação da enzima, seguida por 40 ciclos de: 94° C por 1 min, 58° C por 2 min e 72° C por 2 min; após essa etapa foi realizada uma extensão final a 72° C por 7 min<sup>10</sup>.

#### ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A visualização dos produtos da PCR ocorreu por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,8% contendo 6 µL de Sybr Safe (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) e imerso em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1X. Foram misturados 10 µL da reação de PCR com 1 µL de azul de bromofenol e aplicados no gel para uma eletroforese a 100 V e 400 mA por 30 min. Para análise do padrão das bandas, foi utilizado um marcador de peso molecular de 123 pb (Invitrogen) diluído em tampão TBE 1X<sup>10</sup>. Os amplicons foram visualizados com o sistema de fotodocumentação Gel Doc 1000 (Bio Rad, Hercules, Califórnia, EUA).

#### PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR

O produto da PCR foi purificado visando o sequenciamento de nucleotídeos (nt). Para tal, utilizou-se o kit QIAquick PCR purification (QIAGEN, Hilden, Alemanha) seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante.

#### SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS

Os produtos da PCR foram sequenciados para determinação do genótipo dos VZV pela identificação de mutação no sítio de clivagem da enzima de restrição PstI, a qual resulta na mudança G69349A (ORF38). A mutação C95241T (ORF54) causa a eliminação do sítio de restrição para a enzima BglI. O produto do SNP da ORF22 foi utilizado para análise de mutações nas posições nucleotídicas 37902, 38055, 38081, 38177 e 38229<sup>10</sup>.

Na reação de sequenciamento foi realizada uma mistura de 3,2 pmol de cada oligonucleotídeo correspondente e 10 ng do produto como fonte. Foram realizados 25 ciclos de 96° C por 10 s, 50° C por 5 s e 60° C por 4 min. Os produtos resultantes foram purificados com colunas giratórias (Princeton Separations, Adelphia, Nova Jersey, EUA) e resuspendidos em tampão de eluição (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA)<sup>10</sup>.

Os polimorfismos nucleotídicos específicos do VZV foram analisados em sequenciador automático, 3130X/Genetic Analyzer (AB Applied Biosystems/Hitachi, Chiyoda, Tóquio, Japão) empregando o método Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA)<sup>10</sup>.

#### EDIÇÃO E ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

As sequências nucleotídicas obtidas neste estudo foram alinhadas e editadas usando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.5.2 e comparadas com sequências de outras estirpes do VZV disponíveis no banco de dados (GenBank – National Center for Biotechnology Information, EUA [www.ncbi.nlm.nih.gov]), usando o aplicativo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). As sequências genômicas de cada ORF do VZV foram comparadas entre si, bem como com sequências de outros herpesvírus (vírus herpes simples 1 e 2, vírus Epstein-Barr e citomegalovírus) disponíveis no GenBank<sup>10</sup>.

As estirpes Dumas (X04370), HJ0 (AJ871403), CA 123 (número de acesso no GenBank DQ457052), DR ou Morroco 1 (DQ452050), Var160 ou Mexico\_68 (KC112914.1), pOka (AB097933) e vOka (AB097932) foram utilizadas para comparação das substituições nucleotídicas nas amostras analisadas neste estudo<sup>10</sup>.

#### ANÁLISE FILOGENÉTICA

Os dendrogramas foram construídos utilizando-se o programa MEGA5.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, v5.1.3.308). A análise da distância genética entre as sequências foi calculada pelo algoritmo de *neighbor-joining* (NJ), pelo método de Kimura 2-parâmetros. O método de *bootstrap* com 2.000 réplicas foi utilizado para o cálculo da robustez dos dendrogramas<sup>35</sup>.

#### ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

O estudo não ocasionou qualquer risco ou prejuízo para os participantes ou seus responsáveis. O projeto envolvido no presente estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IEC, bem como pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, quando cabível, sob n° 0028/2009, com parecer de aprovação n° 0004/2009. Quanto aos aspectos de biossegurança, em todos os procedimentos foram utilizados equipamentos de proteção individual, sendo que a manipulação de todo material potencialmente infectante foi realizada em laboratório de segurança NB2, em cabine de segurança biológica classe 2.

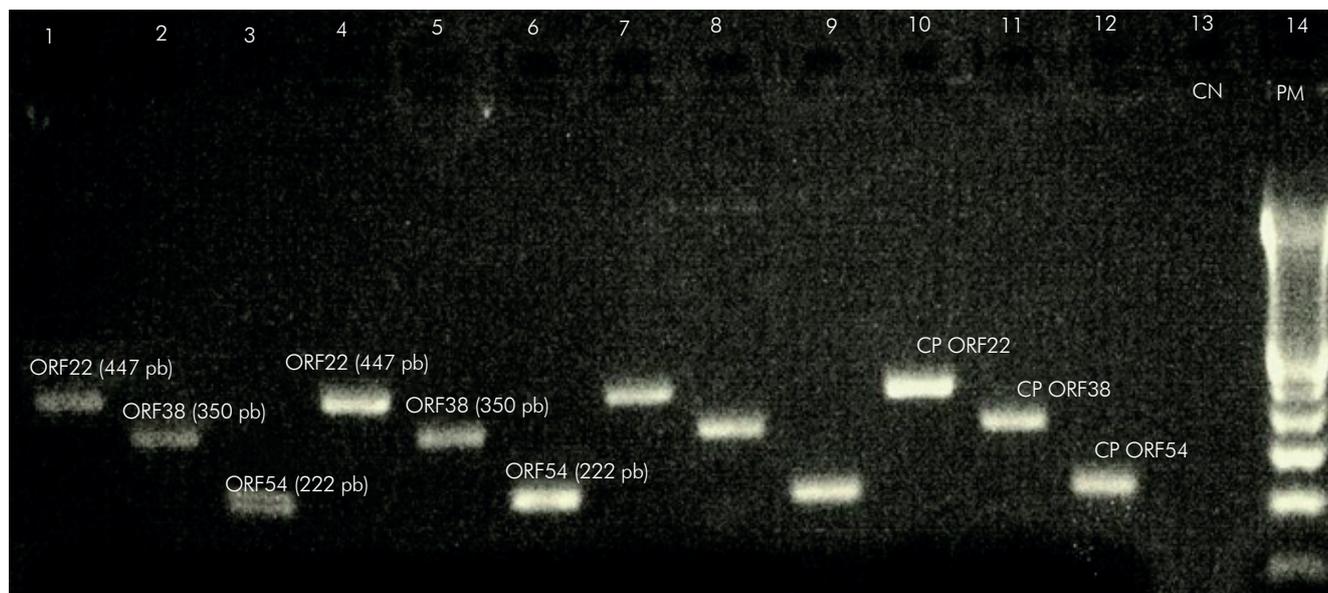
**RESULTADOS**

**SNP UTILIZADOS PARA GENOTIPAGEM DO VZV**

As amostras de swab nasal, oral e de vesículas foram analisadas na PCR. De 93 amostras, apenas 26 indivíduos apresentavam vesículas e desses foram coletados swab. Após a realização da PCR, foram amplificadas 50% das amostras (13/26) e swab de vesículas. As amostras amplificadas e sequenciadas foram analisadas quanto às substituições nucleotídicas

em cinco posições na ORF22, duas posições na ORF38 e duas posições na ORF54 (Figura 1).

As amostras VZ118686 e VZ119611 apresentaram substituições nucleotídicas nas posições A38081C da ORF22 e T95241C, C95300T da ORF54. As amostras VZ118683, VZ118684, VZ118685, VZ118845, VZ119609, VZ119701 e VZ119954 apresentaram mudança de nucleotídeo na posição G69424A da ORF38 (Quadro 2).



CP: controle positivo; CN: controle negativo; PM: peso molecular 123 pb.

**Figura 1** – Visualização dos produtos das ORFs 22, 38 e 54 após PCR

Amostra	ORF22 nucleotídeo						ORF38 nucleotídeo		ORF54 nucleotídeo	
	37902	38019	38055	38081	38177	38229	69349 PstI	69424	95241 BglI	95300
Dumas	A	G	T	A	G	A	A	G	T	C
CA123	A	G	T	C	G	G	A	G	C	T
DR	A	G	C	C	A	A	A	G	C	C
pOka	G	G	C	C	A	A	G	G	C	C
vOka	G	G	C	C	A	A	G	G	C	C
VZ116332	A	G	T	A	A	A	A	G	T	C
VZ116787	A	G	T	A	A	A	A	G	T	C
VZ117441	A	G	T	A	A	A	A	G	T	C
VZ117568	A	G	T	A	A	A	A	G	T	C
VZ118683	A	G	T	A	A	A	A	A	T	C
VZ118684	A	G	T	A	A	A	A	A	T	C
VZ118685	A	G	T	A	A	A	A	A	T	C
VZ118686	A	G	T	C	A	A	A	G	C	T
VZ118845	A	G	T	A	A	A	A	A	T	C
VZ119609	A	G	T	A	A	A	A	A	T	C
VZ119611	A	G	T	C	A	A	A	G	C	T
VZ119701	A	G	T	A	A	A	A	A	T	C
VZ119954	A	G	T	A	A	A	A	A	T	C

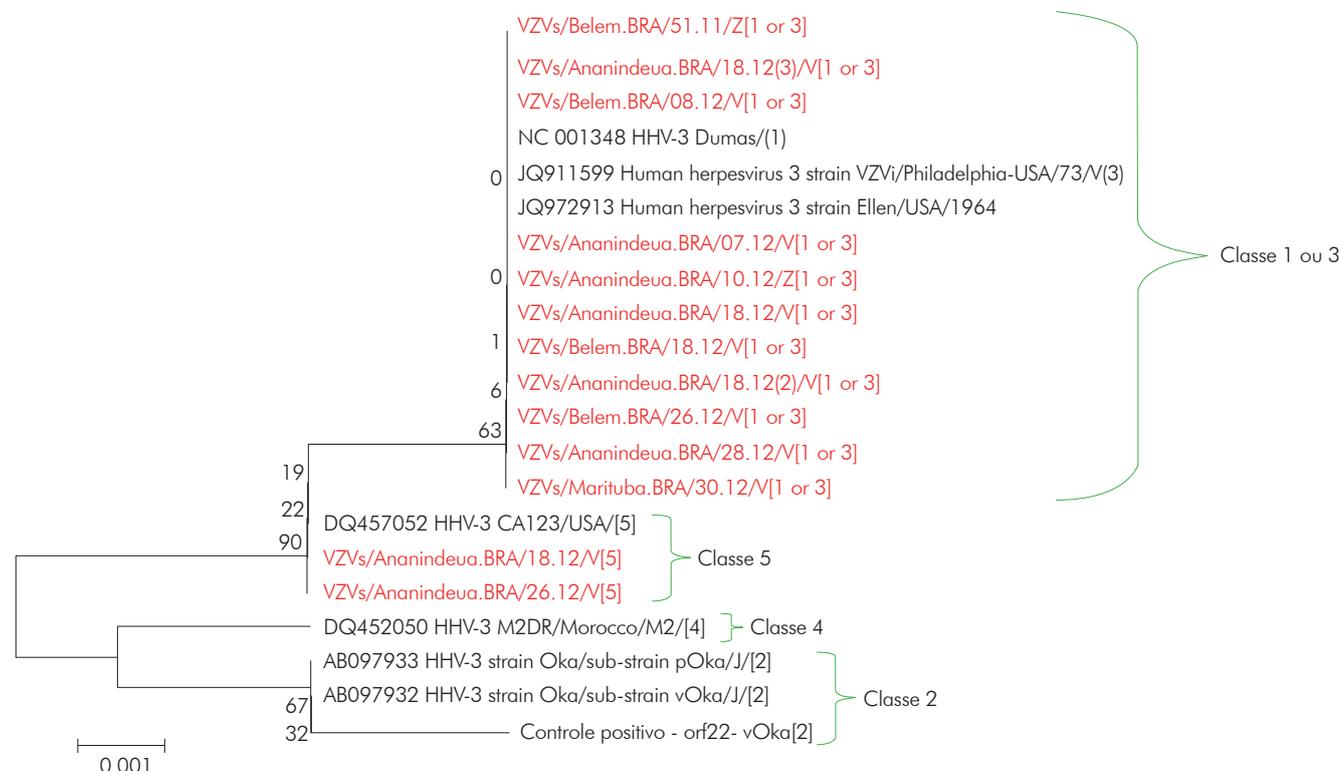
Números nas linhas superiores indicam ORF e a posição do SNP no genoma. As estirpes a seguir foram definidas como referência: Dumas do genótipo E; CA123 e DR do genótipo M; pOka e vOka do genótipo J, para comparação dos pares de bases de posições onde ocorreram mudança de nucleotídeo. O SNP da ORF54 é o sítio usado em alguns protocolos para discriminar a estirpe vacinal Oka de muitas estirpes desconhecidas. A cor lilás indica mutação individual intraespecífica; verde indica mutações comuns com a estirpe de referência do genótipo E; amarela indica mutações em comum com a estirpe Oka parental genótipo J; branco indica bases em comum para ambas estirpes de referência E e J.

**Quadro 2** – Análise de variação genotípica utilizando dados de três ORFs do VZV

Os genótipos 1 ou 3 foram encontrados em 11 amostras VZ, enquanto que duas amostras apresentaram o genótipo 5 (Figura 2).

A análise filogenética mostra a distribuição das estirpes dentro das classes 1 ou 3 e classe 5. Essas

amostras são oriundas dos Municípios de Ananindeua (sete casos de varicela e um de herpes-zoster), Belém (três casos de varicela e um de herpes-zoster) e Marituba (um caso de varicela). A descrição das estirpes e as sequências das amostras analisadas foram cadastradas no GenBank (Quadro 3).



As estirpes de referência utilizadas foram: Dumas, representando o genótipo E; pOka e vOka referência do genótipo J; VZVi/Philadelphia.USA/73/V[3] referência do genótipo E; DR e Morocco 1 referência do genótipo M; e CA 123 referência do genótipo M. Os valores de bootstrap (2.000 pseudoréplicas) estão indicados nos nós da árvore.

**Figura 2** – Análise filogenética utilizando o método de agrupamento de vizinhos (NJ) baseada no polimorfismo nucleotídico da ORF22 (447 pb), envolvendo 13 amostras dos Municípios de Belém, Ananindeua e Marituba

Amostra	Estirpe Isolado/Cidade.País/Semana.Ano/Tipo[Classe]*	Sexo/Idade	Nº de acesso no GenBank		
			ORF22	ORF38	ORF54
116787	VZVs/Belem.BRA/51.11/Z[1 or 3]	F/65	KX352173	KX352186	KX352199
117332	VZVs/Ananindeua.BRA/07.12/V[1 or 3]	F/16	KX352174	KX352187	KX352200
117441	VZVs/Belem.BRA/08.12/V[1 or 3]	M/34	KX352175	KX352188	KX352201
117568	VZVs/Ananindeua.BRA/10.12/Z[1 or 3]	M/49	KX352176	KX352189	KX352202
118645	VZVs/Ananindeua.BRA/18.12/V[1 or 3]	F/8	KX352177	KX352190	KX352203
118683	VZVs/Belem.BRA/18.12/V[1 or 3]	M/12	KX352178	KX352191	KX352204
118684	VZVs/Ananindeua.BRA/18.12(2)/V[1 or 3]	M/8	KX352179	KX352192	KX352205
118685	VZVs/Ananindeua.BRA/18.12(3)/V[1 or 3]	F/8	KX352180	KX352193	KX352206
118686	VZVs/Ananindeua.BRA/18.12/V[5]	F/31	KX352181	KX352194	KX352207
119609	VZVs/Belem.BRA/26.12/V[1 or 3]	M/7	KX352182	KX352195	KX352208
119611	VZVs/Ananindeua.BRA/26.12/V[5]	F/7	KX352183	KX352196	KX352209
119701	VZVs/Ananindeua.BRA/28.12/V[1 or 3]	M/22	KX352184	KX352197	KX352210
119954	VZVs/Marituba.BRA/30.12/V[1 or 3]	M/31	KX352185	KX352198	KX352211

\* Descrição da estirpe: espécime (representado pela sigla do vírus "VZV" e a letra "s" sigla da palavra specimen, ambas descritas em inglês), lugar de origem da amostra (cidade e país), período da coleta (semana e ano da coleta), tipo (amostra de origem de casos de varicela "V" ou zoster "Z") e a classe a que pertence a estirpe.

**Quadro 3** – Descrição das estirpes e números de acesso no GenBank

## DISCUSSÃO

Este é um estudo inédito de investigação genotípica do VZV na Região Norte do Brasil, adotando SNP para análise das diferenças entre as classes 1 ou 3 e classe 5<sup>2,13,15</sup>. A preferência por esse método baseou-se no fato de que as técnicas de genotipagem geralmente utilizadas no laboratório devem ser de simples execução e capazes de atingir resultados satisfatórios em amostras com quantidade limitada de DNA, como, por exemplo, a partir de vesículas e crostas.

Alguns estudos mostram que extração e purificação de ácido nucleico nem sempre são necessárias para realização da PCR<sup>36,37</sup>. A amplificação do material torna-se rápida, sensível e com um custo efetivo menor, principalmente quando muitas amostras são analisadas<sup>34</sup>. As amostras deste estudo foram imersas em solução de água destilada e armazenadas em freezer a -70° C por vários meses sem deterioração em qualidade, mesmo após vários ciclos de congelamento e descongelamento.

A PCR de material direto de vesículas é sensível e específica para detecção do VZV, e espécimes de saliva podem funcionar como uma ferramenta de suporte para o diagnóstico em determinados casos em que, após extração com *kit* comercial, a PCR não funciona por baixa quantidade de DNA viral<sup>38</sup>.

Neste estudo, a PCR foi realizada em todas as amostras de *swab* nasal, oral e de vesículas. De 26 amostras coletadas de vesículas e processadas em água destilada submetidas a PCR, 13 (50%) foram amplificadas. As amostras foram coletadas do primeiro até 12° dia após o surgimento das vesículas na pele, sendo que as amostras amplificadas foram coletadas entre o primeiro até o nono dia após o início dos sintomas. O ideal é que essa coleta ocorra até o sétimo dia, quando as vesículas ainda estão produtivas<sup>38,39,40</sup>.

Chun et al<sup>39</sup>, em estudo com crianças que apresentaram varicela pós-vacinal, coletaram amostras de vesículas em *swab*, armazenaram em frasco estéril e posteriormente realizaram extração e purificação do DNA do VZV com *kit* comercial, com positividade de 58%. Esses resultados foram superiores aos encontrados em outros dois estudos, que utilizavam a mesma metodologia de extração e purificação, com presença do DNA do VZV em 46%<sup>40</sup> e 35%<sup>41</sup>, respectivamente.

Resultados semelhantes foram encontrados em estudo realizado na Suíça em que o DNA do VZV estava presente em 21 (47%) de 45 amostras de soro coletadas até os primeiros oito dias da fase aguda da doença<sup>42</sup>.

A análise das sequências das ORFs 22, 38 e 54 associou a semelhança das estirpes encontradas nesta pesquisa com as classificadas dentro das classes 1 ou 3 e classe 5. Do total de 13 estirpes isoladas, apenas duas apresentaram genótipo classe 5, sendo as

demais classificadas em classe 1 ou 3. Vários estudos demonstraram uma distribuição geográfica distinta dos principais genótipos do VZV quando compararam as regiões de clima temperado com as de clima tropical<sup>19,22,26,28,43,44,45</sup>. O domínio regional de genótipos específicos poderia ter sido estabelecido pelo clima e/ou outros fatores, como interações vírus-hospedeiro ou introdução de estirpes em uma população inócua ao VZV, por meio da imigração ou viagens. Estratégias modernas de genotipagem podem ajudar a resolver essas questões. As regiões em que vários genótipos VZV predominam, e esses dados, combinados com os padrões migratórios históricos humanos, contribuem para identificar os prováveis pontos de origem para esses genótipos<sup>19</sup>. A presença de dois tipos diferentes de genótipos neste estudo pode estar associada a um ou mais desses fatores.

Na Argentina, estudo utilizando a mesma técnica de análise da ORF22 em amostras de *swab* de vesículas encontrou apenas estirpes de genótipo E (classe 1 ou 3) em amostras de 13 crianças com varicela<sup>43</sup>.

Os resultados deste estudo, realizado na região metropolitana de Belém, também mostraram um predomínio da classe 1 ou 3, com 11 amostras de VZV, e diferem, portanto, do estudo no qual, de dez amostras de VZV coletadas no Brasil, oito estirpes foram classificadas como classe 5 e apenas duas como pertencentes à classe 1 ou 3<sup>2,13</sup>.

O genoma do VZV é muito estável e a variação na sequência do DNA observada ocorre, geralmente, como mutações pontuais individuais. Essa justificativa é plausível e indica que um pequeno número de variantes favorecidas ocorre independentemente entre as estirpes do tipo selvagem, em mais de uma localização geográfica. A literatura ressalta que não se pode descartar a possibilidade de que o VZV de classe 5 tenha surgido, primeiramente, nas regiões tropicais, quando sofreram mutações depois que ocorreram as migrações humanas para o clima temperado. Estirpes classes 1, 2 e 3 podem ter surgido independentemente da 5 como resultado do isolamento das ilhas japonesas e as explorações e colonização dos europeus em diversos continentes, respectivamente<sup>2,13</sup>.

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

Na Índia, pesquisadores observaram, em avaliações clínicas, que estudantes com varicela apresentavam vesículas largas com tamanho maior que 8 mm em

diâmetro, semelhante ao que ocorre com pacientes adultos do sexo masculino infectados pelo genótipo classe 5 do VZV<sup>36</sup>. Duas regiões do VZV que têm sido utilizadas para investigar as transmissões hospitalares são a R1 na ORF11 e OriS<sup>2,37,38</sup>. No entanto, os parâmetros precisos que informarão a sua utilização para a investigação de surtos ainda não estão estabelecidos. Os genótipos mais associados com hospitalizações de pacientes com varicela continuam desconhecidos, e a virulência de um genótipo pode ser influenciada mais pelo nível de resposta do hospedeiro e sua imunidade que por um genótipo específico<sup>46,47</sup>.

Uma vigilância quanto aos tipos de genótipos do VZV é importante, especialmente para monitoramento de eventos adversos futuros causados pela varicela, e a análise de polimorfismos no genoma do vírus em momentos diferentes permitiria estimar sua taxa evolucionária<sup>48</sup>.

Neste estudo foi possível a avaliação do genótipo de apenas duas amostras de pacientes com herpes-zoster. A análise genotípica em amostras de pacientes com herpes-zoster poderia proporcionar uma avaliação mais detalhada de quanto tempo determinada estirpe circula no País (taxa evolucionária), além de avaliar as estirpes mais associadas à reativação viral e surgimento do herpes-zoster anos após a infecção primária pelo VZV.

A infecção primária com VZV ocorre, geralmente, durante a infância, por volta dos 10 anos de idade<sup>49</sup>. O herpes-zoster desenvolve-se a partir da reativação do VZV e a estirpe isolada em casos de zoster é a mesma encontrada em infecções por esse vírus adquiridas na infância. Portanto, uma estirpe do VZV isolado de uma paciente de 70 anos de idade com herpes-zoster, na Coreia do Sul, provavelmente circulou

cerca de 60 anos atrás, na década de 1940<sup>50</sup>. Neste estudo, a amostra de VZV a partir de um caso de herpes-zoster em adulto de 65 anos de idade, oriundo de Belém, revelou estirpe do genótipo classe 1 ou 3, sugerindo que a mesma já circula por, no mínimo, cerca de cinco décadas no Brasil. Outra amostra de paciente com herpes-zoster também foi identificada como classe 1 ou 3, esse com idade de 45 anos, o qual sempre residiu em Ananindeua, mas serão necessários estudos de análise de taxa evolucionária para melhor estimar o período em que as classes 1 ou 3 foram introduzidas na região.

A análise das ORFs 21 e 50 é necessária para definição das estirpes de genótipo europeu (E1 e E2) em classe 1 ou 3<sup>2,19</sup>. Outros estudos de genotipagem são necessários para acompanhar o possível impacto da vacinação na circulação de genótipos do VZV no Brasil, além de possíveis associações com diferentes quadros clínicos e a possibilidade de análise da taxa evolucionária do vírus.

Este é um estudo inédito no Brasil, pois é a primeira vez que o VZV tem o genótipo definido por testes realizados em uma instituição de pesquisa nacional.

## CONCLUSÃO

Os genótipos do VZV foram classificados em classes 1 ou 3 e classe 5. O genótipo classe 1 ou 3 foi encontrado nos Municípios de Ananindeua, Belém e Marituba, sendo que o classe 5 foi encontrado apenas em Ananindeua. A PCR foi sensível em 13 amostras de material direto de vesículas, enquanto que em amostras de saliva não foi obtido sucesso. A investigação das ORFs 21 e 50 é importante para definição das classes 1 e 3 nas amostras analisadas. Outros estudos são necessários para identificar os genótipos do VZV circulantes no Brasil.



## Varicella-zoster virus: identification of genotypes in cases of varicella and herpes zoster in the Municipalities of Ananindeua, Belém and Marituba, Pará State, Brazil

### ABSTRACT

This is a cross-sectional study in which the clinical criteria for inclusion of the samples was the clinical suspicion and/or onset of symptoms of chickenpox or shingles in order to genotype varicella-zoster virus (VZV) by the polymerase chain reaction (PCR) and sequencing techniques, with a search of single nucleotide polymorphisms (SNP) subsequently. From November 2008 to March 2012, 93 samples (85 cases of varicella and eight herpes zoster) were collected from oral, nasal swab and secretion of ruptured vesicles in several anatomical sites (49 male and 44 female). Dumas and Oka parental strains were included as European genotypes of the reference standard (class 1 or 3) and Japanese (class 2) genotypes, respectively. Strains with the SNP variability were classified into a group of genotype describe as Mosaic (class 5). Classes 1 or 3 were identified in 11 samples of VZV, nine cases of varicella and two cases of herpes zoster, while two samples showed the class genotype 5, both cases of varicella. The genotype class 1 or 3 was found in the Municipalities of Ananindeua, Belém and Marituba, Pará State, Brazil, and genotype class 5 only in Ananindeua. PCR was sensitive in just 13 samples of direct vesicles material, but in saliva samples there were not positive results.

**Keywords:** Varicella-Zoster Virus; Chickenpox; Shingles; Genotypes; Polymerase Chain Reaction; Single Nucleotide Polymorphisms.

## Virus de la varicela zóster: identificación de los genotipos en casos de varicela y herpes zóster en los Municipios de Ananindeua, Belém y Marituba, Estado de Pará, Brasil

### RESUMEN

Este es un estudio de tipo transversal, en que el criterio clínico para inclusión de las muestras fue la sospecha clínica y/o aparición de síntomas de varicela o herpes zóster para identificación de los genotipos del virus de la varicela zóster (VVZ), por intermedio de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación, con posterior estudio de polimorfismo de nucleótido único (SNP). De noviembre de 2008 a marzo de 2012, se recolectaron 93 muestras (85 casos de varicela y ocho de herpes-zóster) de hisopado nasal, oral y de secreción de vesículas rotas en varios sitios anatómicos (49 de individuos del sexo masculino y 44 del femenino). Las estirpes Dumas y Oka parental fueron incluidas como referencia estándar de los genotipos Europeo (clase 1 o 3) y Japonés (clase 2), respectivamente. Estirpes con variabilidad en el SNP se clasificaron dentro de un grupo de genotipo denominado Mosaico (clase 5). Las clases 1 o 3 fueron identificadas en 11 muestras del VVZ, nueve casos de varicela y dos casos de herpes-zóster, mientras que dos muestras presentaron el genotipo de clase 5, ambos casos de varicela. El genotipo clase 1 o 3 se encontró en los Municipios de Ananindeua, Belém y Marituba, Estado de Pará, Brasil, siendo que el genotipo clase 5 solamente en Ananindeua. La PCR fue sensible en 13 muestras de material directo de vesículas, mientras que en muestras saliva no se obtuvo suceso.

**Palabras clave:** Virus de la Varicela-Zóster; Varicela; Herpes Zóster; Genotipos; Reacción en Cadena de la Polimerasa; Polimorfismos de Nucleótido Simple.



### REFERÊNCIAS

- 1 Davison AJ, Scott JE. The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *J Gen Virol.* 1986 Sep;67(9):1759-816.
- 2 Breuer J, Grose C, Norberg P, Tipples G, Schmid DS. A proposal for a common nomenclature for viral clades that form the species varicella-zoster virus: summary of VZV Nomenclature Meeting 2008, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, 24-25 July 2008. *J Gen Virol.* 2010 Apr;91(4):821-8.
- 3 Hope-Simpson RE. The nature of herpes zoster: along term study and a new hypothesis. *Proc R Soc Med.* 1965 Jan;58(1):9-20.
- 4 Hambleton S, Gershon AA. Preventing varicella-zoster disease. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Jan;18(1):70-80.
- 5 Hondo R, Yogo Y, Yoshida M, Fujima A, Itoh S. Distribution of varicella-zoster virus strains carrying a PstI-site-less mutation in Japan and DNA change responsible for the mutation. *Jpn J Exp Med.* 1989 Dec;59(6):233-7.
- 6 LaRussa P, Lungu O, Hardy I, Gershon A, Steinberg SP, Silverstein S. Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products from vaccine and wild-type varicella-zoster virus isolates. *J Virol.* 1992 Feb;66(2):1016-20.
- 7 LaRussa P, Steinberg S, Arvin A, Dwyer D, Burgess M, Menegus M, et al. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of varicella-zoster virus isolates from the United States and other parts of the world. *J Infect Dis.* 1998 Nov;178 Suppl 1:64-6.
- 8 Loparev VN, Argaw T, Krause PR, Takayama M, Schmid DS. Improved identification and differentiation of varicella-zoster virus (VZV) wild-type strains and an attenuated varicella vaccine strain using a VZV open reading frame 62-based PCR. *J Clin Microbiol.* 2000 Sep;38(9):3156-60.
- 9 Loparev VN, McCaustland K, Holloway BP, Krause PR, Takayama M, Schmid DS. Rapid genotyping of varicella-zoster virus vaccine and wild-type strains with fluorophore-labeled hybridization probes. *J Clin Microbiol.* 2000 Dec;38(12):4315-9.
- 10 Collins FS. Sequencing the human genome. *Hosp Pract.* 1997 Jan;32(1):35-43.
- 11 Barret-Muir W, Hawrami K, Clarke J, Breuer J. Investigation of varicella-zoster virus variation by heteroduplex mobility assay. In: Gershon AA, Arvin AM, Calisher CH, editors. *Immunity to and prevention of herpes Zoster.* New York: Springer-Verlag Wien; 2011. p. 17-25.
- 12 Faga B, Maury W, Bruckner DA, Grose C. Identification and mapping of single nucleotide polymorphism in the varicella-zoster virus genome. *Virology.* 2001 Feb;280(1):1-6.
- 13 Loparev VN, Gonzalez A, Carnes MD, Tipples G, Fickenscher H, Torfason EG, et al. Three major genotypes of varicella-zoster virus: geographical clustering and strategies for genotyping. *J Virol.* 2004 Aug;78(15):8349-58.
- 14 Muir WB, Nichols R, Breuer J. Phylogenetic analysis of varicella-zoster virus: evidence of intercontinental spread of genotypes and recombination. *J Virol.* 2002 Feb;76(4):1971-9.

- 15 Kenyon TK, Lynch J, Hay J, Ruyechan W, Grose C. Varicella-zoster virus ORF47 protein serine kinase: characterization of a cloned, biologically active phosphotransferase and two viral substrates, ORF62 and ORF63. *J Virol*. 2001 Sep;75(18):8854-8.
- 16 Peters GA, Tyler SD, Grose C, Severini A, Gray MJ, Upton C, et al. A full-genome phylogenetic analysis of Varicella-zoster virus reveals a novel origin of replication-based genotyping scheme and evidence recombination between major circulating clades. *J Virol*. 2006 Oct;80(19):9850-60.
- 17 Koskiniemi M, Lappalainen M, Schmid DS, Rubtcova E, Loparev VN. Genotypic analysis of varicella-zoster virus and its seroprevalence in Finland. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 Sep;14(9):1057-61.
- 18 Loparev VN, Rubtcova EN, Bostik V, Govil D, Birch CJ, Druce JD, et al. Identification of five major and two minor genotypes of varicella-zoster virus strains: a practical two-amplicon approach used to genotype clinical isolates in Australia and New Zealand. *J Virol*. 2007 Dec;81(23):12758-65.
- 19 Loparev V, Martro E, Rubtcova E, Rodrigo C, Piette JC, Caumes E, et al. Toward universal varicella-zoster virus (VZV) genotyping: diversity of VZV strains from France and Spain. *J Clin Microbiol*. 2007 Feb;45(2):559-63.
- 20 Zell R, Taudien S, Pfaff F, Wutzler P, Platzer M, Sauerbrei A. Sequencing of 21 varicella-zoster virus genomes reveals two novel genotypes and evidence of recombination. *J Virol*. 2012 Feb;86(3):1608-22.
- 21 Depledge DP, Gray ER, Kundu S, Cooray S, Poulsen A, Aaby P, et al. Evolution of cocirculating varicella-zoster virus genotypes during a chickenpox outbreak in Guinea-Bissau. *J Virol*. 2014 Dec;88(24):13936-46.
- 22 Jiang L, Gan L, Chen J, Wang M. Genetic analysis of clinical VZV isolates collected in China reveals a more homologous profile. *Biomed Res Int*. 2013;(681234):1-6.
- 23 Sauerbrei A, Rubtcova E, Wutzler P, Schmid DS, Loparev VN. Genetic profile of an Oka varicella vaccine virus variant isolated from an infant with zoster. *J Clin Microbiol*. 2004 Dec;42(12):5604-8.
- 24 Sergeev N, Rubtcova E, Chizikov V, Schmid DS, Loparev VN. New mosaic subgenotype of varicella-zoster virus in the USA: VZV detection and genotyping by oligonucleotide-microarray. *J Virol Methods*. 2006 Sep;136(1-2):8-16.
- 25 Norberg P, Liljeqvist JA, Bergström T, Sammons S, Schmid DS, Loparev VN. Complete genome phylogenetic approach to varicella-zoster virus evolution: genetic divergence and evidence for recombination. *J Virol*. 2006 Oct;80(19):9569-76.
- 26 Quinlivan M, Hawrami K, Barret-Muir W, Aaby P, Arvin A, Chow VT, et al. The molecular epidemiology of varicella-zoster virus: evidence for geographic segregation. *J Infect Dis*. 2002 Oct;186(7):888-94.
- 27 Sengupta N, Taha Y, Scott FT, Leedham-Green ME, Quinlivan M, Breuer J. Varicella-zoster virus genotypes in East London: a prospective study in patients with herpes zoster. *J Infect Dis*. 2007;196(7):1014-20.
- 28 Barrett-Muir W, Scott FT, Aaby P, John J, Matondo P, Chaudhry QL, et al. Genetic variation of varicella-zoster virus: evidence for geographical separation of strains. *J Med Virol*. 2003;70(Suppl 1):S42-7.
- 29 Carvalho ES, Martins RM. Varicela: aspectos clínicos e prevenção. *J Pediatr*. 1999 jan-fev;75(supl 1):S126-34.
- 30 Kupek E, Tritany EF. Impacto da vacinação contra varicela na redução da incidência da doença em crianças e adolescentes de Florianópolis (SC). *J Pediatr*. 2009 ago;85(4):365-8.
- 31 Secretaria de Estado da Saúde (São Paulo). Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória e Divisão de Imunização. Instruções sobre a utilização de imunobiológicos para controle de varicela em creches [Internet]. São Paulo: CVE; 2003 [citado 2005 set 30]. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/resp/pdf/inst\\_varicela.pdf](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/resp/pdf/inst_varicela.pdf).
- 32 Hirose M, Gilio AE, Ferronato AE, Ragazzi SLB. The impact of varicella vaccination on varicella-related hospitalization rates: global data review. *Rev Paul Pediatr*. 2016;34(3):359-66.
- 33 Dinelli MIS, Ono E, Viana PO, Spina FG, Weckx LY, Santos AMN, et al. Response to immunization in children born to renal transplant recipients using immunosuppressive drugs during gestation. *Vaccine*. 2016 Jan;34(4):404-7.
- 34 Sakai K, Wakasugi S, Muchemwa FC, Ihn H. Quick detection of herpes viruses from skin vesicles and exudates without nucleic acid extraction using multiplex PCR. *Biosci Trends*. 2008 Aug;2(4):164-8.
- 35 Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987 Jul;4(4):406-25.
- 36 Pandori MW, Lei J, Wong EH, Klausner J, Liska S. Real-Time PCR for detection of herpes simplex virus without nucleic acid extraction. *BMC Infect Dis*. 2006;6(104):1-9.
- 37 Bezold G, Volkenandt M, Gottlöber P, Peter RU. Detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus in clinical swabs: frequent inhibition of PCR as determined by internal controls. *Mol Diagn*. 2000 Dec;5(4):279-84.

- 38 Leung J, Harpaz R, Baughman AL, Heath K, Loparev V, Vázquez M, et al. Evaluation of laboratory methods for diagnosis of varicella. *Clin Infect Dis*. 2010 Jul;51(1):23-32.
- 39 Chun C, Weinmann S, Riedlinger K, Mullooly JP, Houston H, Schmid DS, et al. Laboratory characteristics of suspected herpes zoster in vaccinated children. *Pediatr Infect Dis J*. 2011 Aug;30(8):719-21.
- 40 Jumaan AO, Seward J. The effectiveness of varicella vaccine [letter]. *N Engl J Med*. 2001 Aug;345(6):464-5.
- 41 Watson B, Perella D, Heath K. Laboratory confirmation of suspected breakthrough varicella infections (1927). In: Program and Abstracts of the Pediatric Academic Societies Annual Meeting. 2004 May 1-4; San Francisco, CA. Woodlands (TX): Pediatric Academic Societies; 2004.
- 42 Dobec M, Bossart W, Kaeppli F, Mueller-Schoop J. Serology and serum DNA detection in shingles. *Swiss Med Wkly*. 2008 Jan;138(3-4):47-51.
- 43 Dayan GH, Panero MS, Debbag R, Urquiza A, Molina M, Prieto S, et al. Varicella seroprevalence and molecular epidemiology of varicella-zoster virus in Argentina. *J Clin Microbiol*. 2004 Dec;42(12):5698-704.
- 44 Lolekha S, Tanthiphabha W, Sornchai P, Kosuwan P, Sutra S, Warachit B, et al. Effect of climatic factors and population density on varicella zoster virus epidemiology within a tropical country. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Mar-Apr;64(3-4):131-6.
- 45 Wagenaar TR, Chow VTK, Buranathai C, Thawatsupha P, Grose C. The out of Africa model of varicella-zoster virus evolution: single nucleotide polymorphisms and private alleles distinguish Asian clades from European/North American clades. *Vaccine*. 2003 Mar;21(11-12):1072-81.
- 46 Molyneaux PJ, Parker S, Khan IH, Millar CGM, Breuer J. Use of genomic analysis of varicella-zoster virus to investigate suspected varicella-zoster transmission within a renal unit. *J Clin Virol*. 2006 May;36(1):76-8.
- 47 Tang JW, Eames I, Li Y, Taha YA, Wilson P, Bellingan G, et al. Door-opening motion can potentially lead to transient breakdown in negative-pressure isolation conditions: the importance of vorticity and buoyancy airflows. *J Hosp Infect*. 2005 Dec;61(4):283-6.
- 48 Kolesnik M, Bonnekoh B, Tammer I, Gollnick H, Sauerbrei A. Varicella outbreak in an Indian couple living in Germany caused by VZV clade VI acquired during a trip to the Netherlands. *Case Rep Med*. 2012;2012(838241):1-3.
- 49 Gnann Jr JW, Whitley RJ. Herpes zoster. *N Engl J Med*. 2002 Aug;347(5):340-6.
- 50 Kim KH, Choi YJ, Song KH, Park WB, Jeon JH, Park SW, et al. Genotype of varicella-zoster virus isolates in South Korea. *J Clin Microbiol*. 2011 May;49(5):1913-6.

Recebido em / Received / Recibido en: 10/11/2015  
Aceito em / Accepted / Aceptado en: 6/7/2016