
Diversidade genética dos Echovirus 30 detectados em pacientes com meningite asséptica no estado de São Paulo

Débora de Souza GREGÓRIO*, Rita de Cássia Compagnoli CARMONA

Núcleo de Doenças Entéricas-Centro de Virologia-Instituto Adolfo Lutz

*Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq)

Meningite asséptica (MA) é uma infecção do sistema nervoso central (SNC) que pode ocorrer esporadicamente ou em forma de surtos. Aproximadamente 90% dos casos estão associados aos Enterovírus. Caracterizada pela inflamação das meninges, sem associação bacteriana no líquido cefalorraquidiano (LCR), é desta forma considerada uma doença benigna. Em termos de frequência, o número de casos de meningite asséptica que ocorre anualmente excede o número total de casos de meningite causada por todas as outras etiologias^{1,2}. Os enterovírus humanos (HEV) estão associados a uma variedade de doenças como a poliomielite, encefalite, miocardite, conjuntivites, entre outras². A transmissão do HEV é de pessoa a pessoa, através das vias respiratórias, por gotículas e secreções da nasofaringe, ou por contato direto com as secreções respiratórias do paciente. A transmissão fecal-oral possui relevante importância em infecções por enterovírus.

O Echovirus 30 (EV-30), que pertence à espécie HEV-B, está comumente associado a surtos de MA e presente entre os sorotipos detectados com maior frequência nos últimos anos³. O objetivo do

presente estudo foi conhecer a diversidade genética dos EVs-30 detectados em pacientes com quadro de meningite asséptica no Estado de São Paulo. Foram selecionadas 89 amostras de Enterovírus previamente isolados em culturas de células e identificadas por imunofluorescência indireta (IFI) no período de 2004 a 2011, provenientes de líquido e fezes encaminhadas para diagnóstico laboratorial ao Núcleo de Doenças Entéricas, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz. As amostras selecionadas foram submetidas às técnicas de caracterização molecular, como RT-PCR (transcrição reversa - reação em cadeia pela polimerase) e sequenciamento genômico. Foram utilizados *primers* consenso 292 e 222 para amplificação e sequenciamento parcial do gene VP1 do Enterovírus⁴. O conhecimento da diversidade genética dos sorotipos de EVs por sequenciamento genômico tem sido fundamental para a compreensão da epidemiologia da meningite asséptica na população. Dentre as amostras analisadas, obtivemos amplificação do gene VP1 em 81% (n= 72/89) dos casos positivos para EVs, utilizando RT-PCR. Os produtos amplificados do gene apresentaram 340 pares de bases (Figura 1). Dentre estas, 32% (n= 23/72) dos casos positivos em RT-PCR foram

identificados anteriormente por IFI como sorotipo Echovirus 30. A sequência parcial do gene VP1 do EV foi realizada em sete amostras (30,4%; n=7/23). Destas, cinco amostras sequenciadas foram editadas utilizando o programa *Sequencher 4.1.4* e, em seguida, comparadas com cepas padrões disponíveis na base de dados do GenBank, utilizando *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) no site *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Estas amostras, identificadas anteriormente por IFI, foram confirmadas como Echovirus 30 e quando comparadas com as cepas padrões humanas observou-se identidade de nucleotídeos >90% com amostras provenientes do Brasil, França, Itália, Finlândia, Taiwan, Malásia, China e Japão⁵⁻⁸. O conhecimento da diversidade genética do Echovirus 30 também tem auxiliado na compreensão da epidemiologia da meningite asséptica na população. Devido a isto, as amostras que não puderam ser sequenciadas e as que não apresentaram resultados que permitissem a comparação nos registros de cepas padrões do *GenBank* deverão ser processadas e refeitas. Para conclusão deste estudo, será realizada posteriormente análise filogenética das amostras utilizando programas específicos para classificação destes vírus em Linhagens.

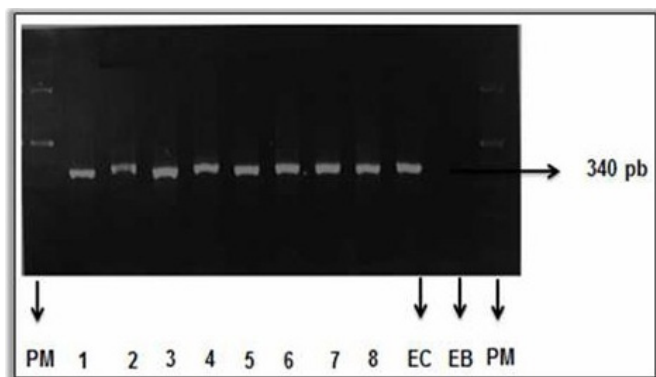


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose. Identificação do gênero *Enterovírus* por RT-PCR da região VP1 utilizando *primers* 292-222. Colunas PM: padrão de peso molecular 100 pares de base – DNA *Ladder*; coluna EB: controle negativo (água Milli-Q); coluna EC: controle positivo (amostra positiva de *Enterovírus*); colunas de 1 a 8: amostras positivas com 340 pb

Agradecimentos

Agradecemos a Heloisa Rosa Vieira e ao Pesquisador Científico Bráulio Caetano Machado do Núcleo de Doenças Entéricas, Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, que colaboraram para a realização do estudo e aos demais colegas da equipe. Apoio CNPq e Fapesp processo nº 2012/50234-5.

REFERÊNCIAS

1. Machado BC, Ferreira RS, Carmona RCC, Timenetsky MCST. Aseptic meningitis by echovirus 30 in São Paulo state, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2007;38(1):97-103.
2. David NI. Aseptic meningitis and viral myelitis. *Neurol Clin.* 2008;26(3):635.
3. Pinto JVL, Rebelo MC, Costa EV, Silva Edson E, Bóia MN. Description of Widespread Outbreak of Aseptic Meningitis due to Echovirus 30 in Rio de Janeiro State, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2009;13(5):367-70.
4. Oberste MS, Nix WA, Maher K, Pallansch MA. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol.* 2003;26(3):375-7.
5. Santos GP, Costa EV, Tavares FN, Costa LJ, Silva EE. Genetic Diversity of Echovirus 30 Involved in Aseptic Meningitis Cases in Brazil (1998–2008). *J Med Virol.* 2011;83(12):2164-71.
6. Castro CM, Oliveira DS, Macedo O, Lima MJ, Santana MB, Wanzeller AL, et al. Echovirus 30 associated with cases of aseptic meningitis in state of Pará, Northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(3):444-50.
7. Bailly JL, Brosson D, Archimbaud C, Chambon M, Henquell C, Peigue-Lafeuille H. Genetic diversity of echovirus 30 during a meningitis outbreak, demonstrated by direct molecular typing from cerebrum spinal fluid. *J Med Virol.* 2002;68(4):558-67.
8. Savolainen C, Hovi T, Mulders MN. Molecular epidemiology of echovirus 30 in Europe: succession of dominant subline ages within a single major genotype. *Arch Virol.* 2001;146(3):521-37.