



Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina

Laboratorial

ISSN: 1676-2444

jbpml@sbpc.org.br,adagmar.andriolo@g
mail.com

Sociedade Brasileira de Patologia
Clínica/Medicina Laboratorial

Varella, Rafael B.; Pires, Ivone L.; Saraiva, Carlos Alberto; Guimarães, Antônio Carlos C.;
Guimarães, Maria Angélica A. M.

Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus herpes simples (HSV) em pacientes
transplantados e não-transplantados

Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, vol. 41, núm. 4, agosto, 2005, pp.
257-262

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial
Rio de Janeiro, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=393541923007>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe , Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus herpes simples (HSV) em pacientes transplantados e não-transplantados

Primeira submissão em 10/08/04
Última submissão em 19/07/05
Aceito para publicação em 04/08/05
Publicado em 20/08/05

Laboratorial diagnosis of herpes simplex virus infection (HSV) in transplanted and non-transplanted patients

Rafael B. Varella; Ivone L. Pires; Carlos Alberto Saraiva; Antônio Carlos C. Guimarães; Maria Angélica A. M. Guimarães

unitermos	resumo
Vírus herpes simples	Introdução: O vírus herpes simples (HSV) é dividido em dois sorotipos (HSV-1 e HSV-2) responsáveis, respectivamente, pelos herpes labial e genital. Embora a infecção pelo HSV tenha um curso rápido, esse agente está freqüentemente relacionado a complicações no tratamento de pacientes imunocomprometidos, como indivíduos transplantados, na condição de agente oportunista. Objetivos: Comparar e avaliar o uso de três técnicas atuais para diagnóstico de HSV em pacientes transplantados e não-transplantados. Material e métodos: Oitenta e quatro amostras clínicas consecutivas provenientes de 47 indivíduos transplantados e 37 não-transplantados foram coletadas de junho de 2001 a julho de 2002, sendo, simultaneamente, submetidas a <i>nested multiplex</i> reação em cadeia da polimerase (PCR) (nmPCR), <i>multiplex</i> PCR (mPCR) e isolamento viral (IV) em células vero. Resultados: Das amostras, 33,3% (28/84) foram positivas para o HSV por IV, 34,5% (29/84) por mPCR e 42,8% (36/84) por nmPCR. Pela técnica de imunofluorescência direta (IFD), 85,7% (24/28) das amostras foram caracterizadas como HSV-1, 86,2% (25/29) pelo mPCR e 88,9% (32/36) pelo nmPCR. Foram caracterizadas como HSV-2 pelas três técnicas empregadas 4,8% (4/84) das amostras. Não houve diferença significante de detecção entre as técnicas de diagnóstico do HSV ($p = 0,38$), embora o nmPCR tenha detectado mais amostras de pacientes transplantados ($p = 0,05$). Conclusão: Apesar do desempenho similar entre as técnicas, o nmPCR se mostrou ferramenta útil para pacientes transplantados ou para aqueles sob tratamento antiviral, onde é esperada baixa carga viral em suas amostras.
Cultura de célula	
PCR	
Transplante	

Background: Herpes simplex virus (HSV) is divided in two serotypes (HSV-1 and HSV-2) responsible for labial and genital herpes, respectively. Although the infection caused by HSV has a rapid course, this agent is frequently related to complications in immunocompromised patient's treatment, like transplanted individuals as an opportunistic agent. **Objectives:** To compare and evaluate three current diagnosis techniques for HSV diagnosis in transplanted and non-transplanted patients. **Material and methods:** 84 consecutive clinical samples from 47 transplanted and 37 non-transplanted individuals were collected from June 2001 to July 2002, being simultaneously submitted to nested multiplex PCR (nmPCR), multiplex PCR (mPCR) and viral isolation (VI) in Vero cells. **Results:** 33.3%(28/84) samples were HSV-positive by VI, 35.4%(29/84) by mPCR and 42.8%(36/84) by nmPCR. 85.7% (24/28) samples were characterized as HSV-1 by the direct immunofluorescence technique (dIF), 86.2%(25/29) by mPCR and 88.9%(32/36) by nmPCR. 4.8%(4/84) samples were characterized as HSV-2 by the three techniques. There was no significant difference regarding HSV diagnosis among the techniques ($p = 0.38$), although nmPCR detected more samples from transplanted patients ($p = 0.05$). **Conclusion:** although the three techniques presented similar performances, the nmPCR revealed to be an useful tool for transplanted patients or those under antiviral treatment, where a low viral load in their samples is expected.

abstract

key words

Herpes simplex virus

PCR

Cell culture

Transplant

Introdução

O vírus herpes simples (HSV) é membro da extensa e heterogênea família *Herpesviridae*, composta por inúmeros patógenos animais e humanos, como citomegalovírus (CMV), Epstein-Barr (EBV) e varicela-zoster (VVZ). O HSV é dividido em dois sorotipos, HSV-1 e HSV-2, responsáveis pelos herpes labial e genital, respectivamente⁽¹⁾. O vírus tem como característica biológica o rápido crescimento em cultivo celular, uma ampla gama de hospedeiros e a capacidade, comum a todos os herpesvírus, de se manter latente em células de seus hospedeiros por tempo indeterminado⁽²⁾.

O herpes é uma das infecções humanas mais comuns^(2,3), embora manifestações mais severas possam ocorrer entre neonatos e indivíduos imunocomprometidos, incluindo HIV-positivos e transplantados⁽⁴⁾. De fato, nesses pacientes, as manifestações causadas pelo herpes podem variar de formações vesiculares limitadas às regiões orofacial e genital até doença disseminada em pele e mucosas, com freqüente acometimento do sistema nervoso central (SNC), deixando seqüelas em 80% de suas vítimas⁽⁵⁾. Além da gravidade e da cronicidade da doença, é comum o relato de isolamento de amostras resistentes ao aciclovir (ACV), a primeira droga de escolha para o tratamento contra o vírus nesse tipo de paciente⁽⁶⁾. Este fator complicador dificulta e redireciona o tratamento para drogas alternativas como valaciclovir, penciclovir e foscarnet, embora problemas de toxicidade e resistência viral já tenham sido detectados para estas drogas⁽⁷⁻¹⁰⁾. Em relação ao diagnóstico laboratorial, o isolamento viral (IV), apesar de lento e trabalhoso, ainda é considerado o método padrão para diagnóstico do HSV, e se baseia na observação de uma cultura de células sob microscópio ótico à procura do efeito citopático (ECP) do vírus sobre a célula⁽¹¹⁾. Entretanto novas técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a captura híbrida, estão em desenvolvimento e vêm sendo capazes de detectar pequenas quantidades de genoma viral numa amostra de forma mais rápida (algumas horas, em contraste com os sete dias, em média, do isolamento)⁽¹¹⁻¹³⁾. Apesar de serem evidentes as vantagens das técnicas moleculares em relação ao isolamento do vírus em cultivo celular, sua aplicação de acordo com a população sob investigação (transplantados e não-transplantados) ainda não tinha sido avaliada.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi comparar e avaliar o emprego de técnicas moleculares e isolamento viral para diagnóstico do HSV em amostras de pacientes transplantados e não-transplantados.

Material e métodos

Coleta de amostras

Oitenta e quatro amostras consecutivas com suspeita clínica de herpes (uma por indivíduo) foram coletadas de 47 transplantados (tx) e de 37 não-transplantados (não-tx) atendidos no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ), de junho de 2001 a julho de 2002. Apenas os indivíduos tx estavam recebendo ACV intravenoso como profilaxia. As amostras foram coletadas de vesículas da pele e de mucosas oral, vaginal e perianal, com auxílio de swab umedecido. O material coletado foi levado ao nosso laboratório em meio de transporte (1ml de MEM [Eagle] com 100UI de penicilina, 20µg/ml de gentamicina e 2,5µg/ml de fungizona) e mantido a 4°C antes do manuseio.

Método de isolamento viral em cultura de células

O isolamento viral foi realizado através da inoculação de 100µl do material vesicular coletado dos pacientes em cultura de células vero (em duplicatas), crescidas nos tubos 13x100 em 1ml de meio de cultura MEM (Eagle) com 2% de soro fetal bovino (Gibco) e acrescida de antibióticos. A cultura de células foi observada diariamente à procura de ECP característico promovido pelo HSV (arredondamento e morte celular) por duas semanas. Na ausência de ECP, passagens cegas eram feitas no 15º dia e o procedimento se repetia mais uma vez.

Identificação do sorotipo do HSV por imunofluorescência direta

A técnica de imunofluorescência direta (IFD) é utilizada para confirmação e sorotipagem do HSV proveniente de isolamento do vírus em cultura de células. Basicamente, células vero apresentando 80% de ECP foram vigorosamente agitadas para separação e centrifugadas (3 mil RPM/5min). Da suspensão celular, 200µl (10⁶ células/1ml de solução tampão salina de fosfato [PBS]) foram centrifugados em lâmina com auxílio de uma citocentrífuga. Após isso, as células aderidas à lâmina foram fixadas com acetona fria por 10min em temperatura ambiente. Anticorpos monoclonais específicos (Pasteur) foram adicionados às células fixadas e incubados à temperatura ambiente por 45 min em câmara escura. Controles positivos e negativos foram utilizados em cada ensaio. Depois da incubação, as lâminas foram lavadas com PBS (pH 7,4) e observadas em microscópio de

fluorescência (Zeiss) à procura de corpúsculos de inclusão, característicos do HSV.

Diagnóstico e tipagem das amostras por PCR

Para a realização das técnicas de PCR (*multiplex* PCR e *nested multiplex* PCR), uma extração prévia do DNA viral foi feita com proteinase K (Gibco BRL), de acordo com instruções do fabricante. Para o mPCR, foram empregados *primers* (Gibco BRL) específicos para ambos os sorotipos de HSV e para cada um deles, separadamente (**Tabela 1**). No caso do nmPCR, *primers* (Gibco BRL) para os genes US-4 e UL-42, específicos para HSV-2 e HSV-1, respectivamente, foram empregados (Tabela 1). O mPCR foi feito em um volume de 50µl contendo 2,5µl da amostra clínica, 1,5mM de MgCl₂, 50mM de KCl, 10mM de Tris/HCl, 200µM de dNTPmix, 0,2µM de cada *primer* e 2,5U de *taq-polymerase* (Gibco-BRL). A amplificação foi realizada em 35 ciclos tal como segue: desnaturação a 94°C por 48s, anelamento a 55°C por 18s e alongamento a 72°C por 48s. A primeira fase do nmPCR foi feita em 25µl de solução contendo 5µl da amostra clínica, 1,5mM de MgCl₂, 50mM de KCl, 10mM de Tris/HCl, 440µM de dNTPmix, 0,44µM de cada *primer* externo e 2,5U de *taq-polymerase*. A amplificação foi realizada como já descrito. Na segunda fase, 5µl do material amplificado obtido no primeiro ciclo foram reamplificados sob as mesmas condições da primeira fase, utilizando-se 0,2µM de cada *primer* interno (Tabela 1). A amplificação foi feita em 15 ciclos: desnaturação a 94°C por 48s, anelamento a 65°C por 18s e alongamento a 72°C por 48s. Os *amplicons* foram adicionados ao gel de agarose (2%) previamente corado com brometo de etídio para eletroforese por duas

horas. Após esse período o gel foi visualizado em leitor de ultravioleta.

Avaliação da capacidade de detecção das técnicas de diagnóstico empregadas

Com o objetivo de comparar os dois métodos de PCR utilizados neste estudo com o isolamento viral, desenvolvemos um teste semelhante ao empregado por Diaz-Mitoma *et al.*⁽¹⁴⁾. Amostras-padrão de HSV-1 e HSV-2 foram diluídas (1:10) e 50µl de cada diluição (amostra bruta até a diluição de 10⁻⁸) foram inoculados em tubos contendo células vero. Após 48h, a cultura celular foi observada na procura de efeito citopático induzido pelo HSV. O sobrenadante de cada tubo foi coletado e submetido aos PCRs como descrito anteriormente.

Resultados

Isolamento do HSV em cultura celular e sorotipagem por imunofluorescência direta

Das 84 amostras inoculadas em cultura de células vero, 24 (33,3%) apresentaram efeito citopático sugestivo de HSV (**Tabela 2**). O isolamento viral detectou 25/37 (67,6%) e 3/47 (6,4%) amostras de pacientes tx e não-tx, respectivamente (Tabela 2). A técnica de IFD revelou que 24/28 (85,7%) e 4/28 (14,3%) das amostras pertenciam aos subtipos HSV-1 e HSV-2, respectivamente (**Tabela 3, Figura 1**). Das 4/28 (14,3%) amostras caracterizadas como sorotipo 2, 2/4 (50%) foram coletadas da área genital,

Tabela 1 Seqüência de *primers* utilizados para mPCR e nmPCR

Técnica	Primer	Seqüência (5'-3')	Gene alvo	Produto
mPCR	HSV1 P3-1	CCTCGCGTTCTGCCTGGCTCC	DNApol	469pb
	HSV1e 2 P5	ATGGTGAAACATCGACATGTACGG	DNA-pol	-
	HSV2 P3-2	CCTCCTTGTGAGGCCCGAAC	DNA-pol	391pb
nmPCR	HSV1-D2 primer externo	GCT TTG TGG TGG TT	UL-42	
	HSV1-R2 primer externo reverso	CTG GTG GTG GAC CAC AC	UL-42	
	HSV1-D3 primer interno	CCC CGA CGT TCA GTT GCG CCT GAC G	UL-42	
	HSV1-R3 primer reverso interno	TCC TCG CGG GCA AAG GTG ACG C	UL-42	159pb
	HSV2-D1 primer externo	ACG TAC TAC CGG CTC AC	US-4	
	HSV2-R1 primer externo reverso	CCA CCT CTA CCC ACA AC	US-4	
	HSV2-D3 primer interno	CCG CGC CTG CCG TCA GCC CAT CCT C	US-4	
	HSV2-R3 primer reverso interno	AGA CCC ACG TGC AGC TCG CCG	US-4	225pb

enquanto as outras duas da região orolabial. Das 24/28 (85,7%) amostras caracterizadas como sorotipo 1, 20/24 (83,3%) foram coletadas da região orolabial, 3/24 (12,5%) da região perianal e 1/24 (4,2%) do dedo (Tabela 3).

Detecção e tipagem das amostras por multiplex PCR e nested multiplex PCR

Das 84 amostras, 29 (34,5%) foram positivas por mPCR, enquanto 36 (42,8%), por nmPCR (Tabela 2, **Figuras 2** e **3**). O mPCR detectou 25/37 (67,6%) e 4/47 (8,5%) amostras de pacientes não-tx e tx, respectivamente, enquanto o nmPCR, 26/37 (70,3%) e 10/47 (21,3%) amostras de pacientes não-tx e tx, respectivamente (Tabela 2). O nmPCR caracterizou 32/36 (88,8%) amostras de HSV-1 e 4/36 (11,1%) como HSV-2, enquanto o mPCR detectou as mesmas 4/29 (13,8%) amostras de HSV-2 e 25/29 (86,2%) de HSV-1 (Tabela 3). Nenhuma discrepância em relação à tipagem das amostras ocorreu entre as técnicas moleculares e o isolamento viral (Tabela 3).

Avaliação da capacidade de detecção das técnicas empregadas

A comparação entre o isolamento viral e as técnicas de PCR (mPCR e nmPCR) revelou que o efeito citopático em cultura de células foi observado até a diluição de 10^{-1} ,

Comparação entre as diferentes técnicas de diagnóstico			
Técnica	Positivos ¹	Positivos ²	Total
	%	%	%
IV	67,6 (25/37)	6,4 (3/47)	33,33 (28/84)
mPCR	67,6 (25/37)	8,5 (4/47)	34,5 (29/84)
nmPCR	70,3 (26/37)	21,3 (10/47)	42,9 (36/84)
<i>p</i>	0,95	0,05	0,38

1: pacientes não-transplantados; 2: pacientes transplantados

enquanto o genoma viral foi detectado visualmente até as diluições de 10^{-3} e 10^{-5} para o mPCR e o nmPCR, respectivamente. O resultado, portanto, revelou que o nmPCR foi capaz de detectar o HSV em uma quantidade 10^2 e 10^4 menores do que as técnicas de mPCR e isolamento viral, respectivamente.

Discussão

As manifestações clínicas causadas pelo vírus herpes simples variam do herpes labial comum até encefalites fatais e necrose de órgãos. Essa enorme variabilidade de

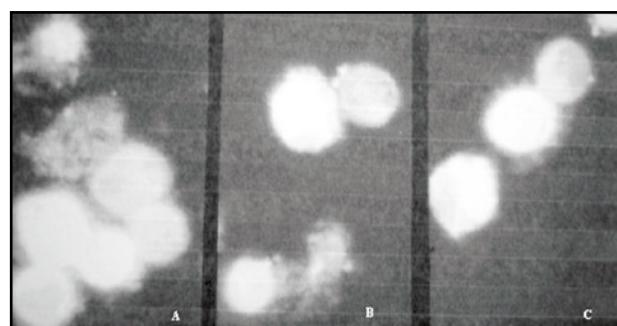


Figura 1



Figura 2



Figura 3

Tabela 3 Diagnóstico de HSV de acordo com o sítio da lesão

Local	Vesícula oral	Mucosite oral	Úlcera	Vesícula genital	Vesícula perianal	Vesícula de pele	Total
Técnica							
IV	19 ¹ (2) ²	1 (0)	-	0 (2)	3 (0)	1 (0)	24 (4)
mPCR	20 (2)	1 (0)	-	0 (2)	3 (0)	1 (0)	25 (4)
nmPCR	22 (2)	3 (0)	2 (0)	0 (2)	3 (0)	1 (0)	32 (4)

1: HSV-1; 2: HSV-2.

sintomas clínicos depende da virulência e da resistência da cepa viral à medicação, além do *status* imunológico do paciente⁽¹⁵⁾.

O diagnóstico laboratorial para o HSV tem aplicação complementar para as manifestações comuns causadas pelo vírus (vesículas orolabiais e genitais), embora seja importante para indivíduos imunocomprometidos, transplantados, gestantes, recém-natos e em suspeita de encefalite. Em todos os casos e, principalmente, para os de maior gravidade, é necessário o desenvolvimento de técnicas diagnósticas mais rápidas e sensíveis que possam detectar o vírus em tecidos diferentes e em pequenas quantidades^(16, 17).

O isolamento viral, padrão-ouro para o diagnóstico de herpes, apesar de sua boa sensibilidade^(18, 19), tem sido substituído por técnicas moleculares como a PCR⁽²⁰⁻²²⁾. Tais técnicas são de rápida execução e mais sensíveis do que as convencionais.

A técnica de nmPCR empregada neste estudo foi capaz de detectar um número significativamente maior de amostras provenientes de pacientes tx ($p = 0,05$), embora não tenham sido observadas diferenças significantes quando compararmos essa técnica com o mPCR e o isolamento viral para amostras de pacientes não-tx ($p = 0,95$) (Tabela 2). Esse aparente desacordo pode ser explicado pelo fato de os pacientes tx sob contínuo tratamento profilático com o ACV apresentarem amostras com baixa carga viral, permitindo que uma técnica mais sensível, como o nmPCR, possa detectar o vírus. O desempenho superior do nmPCR já era esperado, pois se trata de uma técnica que se diferencia das demais pela característica metodológica de realizar PCR sobre um *amplicom (nested)*, aumentando ainda mais as chances de detecção. Já os pacientes não-tx (sem tratamento antiviral profilático) apresentariam amostras com carga

viral mais elevada, permitindo que técnicas com menor sensibilidade, como o mPCR e o isolamento viral, detectassem o HSV mesmo quando um desempenho superior do mPCR fosse esperado (34,5% vs. 33,3% do isolamento viral). Esse fato também explica o baixo índice de positivos entre os transplantados de uma forma geral.

Além dos pacientes tx, algumas amostras exclusivamente diagnosticadas por nmPCR eram provenientes de mucosites e úlceras, que possuem carga viral notadamente mais reduzida. Tal capacidade de detecção foi confirmada quando observamos uma superioridade de 2 e 4log do nmPCR em relação ao mPCR e o isolamento viral, respectivamente.

Em relação à presença de sintomas, observamos que 62,5% dos indivíduos tx apresentavam manifestações semelhantes às do herpes, notadamente mucosite, sem a presença do HSV, em contraste com apenas 16,6% dos pacientes não-tx ($p < 0,002$) (dado não-apresentado). A medicação antiviral, somada a drogas imunossupressoras e agentes oportunistas, pode ter causado essa alta prevalência de manifestações *herpes-like*⁽¹⁴⁾, que devem ser consideradas previamente à medicação.

Conclusão

Os resultados aqui obtidos indicam que a técnica de nmPCR, apesar de apresentar taxas de detecção semelhantes ao PCR e ao isolamento viral para pacientes não-tx, mostrou-se uma ferramenta extremamente útil para o diagnóstico de herpes, especialmente para situações em que os métodos convencionais são falhos, como para pacientes transplantados e em suspeita de encefalite herpética, em que um resultado rápido e sensível é vital⁽²³⁾.

Referências

1. BOVIN, G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes*, v. 2, suppl., p. 48-56, 2004.
2. COLLINS, P.; ELLIS, N. Sensitivity monitoring of clinical isolates of herpes simplex virus to acyclovir. *J Med Virol*, v. 1, suppl., p. 58-66, 1999.
3. COYLE, P. V. et al. A comparison of virus isolation, indirect immunofluorescence and nested polymerase chain reaction for the diagnosis of primary and recurrent herpes simplex I and type 2 infections. *J Virol Meth*, v. 83, p. 75-82, 1999.
4. CULLEN, A. P.; LONG, C. D.; LÖRINCZ, A. T. Rapid detection and typing of herpes simplex virus DNA in clinical specimens by the hybrid capture II signal amplification probe test. *J Clin Microbiol*, v. 35, n. 9, p. 2275-8, 1997.
5. DAN, K. et al. Quantitation of herpes simplex viral DNA in Vero cells for evaluation of a new antiviral agent using the polymerase chain reaction. *J Virol Meth*, v. 76, p. 73-9, 1998.
6. DIAZ-MITOMA, F. et al. Detection of viral DNA to evaluate outcome of antiviral treatment of patients with recurrent genital herpes. *J Clin Microbiol*, v. 34, n. 3, p. 657-63, 1996.
7. ERLICH, K. S. et al. Acyclovir-resistant herpes simplex virus infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*, v. 320, p. 293-6, 1989.
8. GERSHENGORN, H. B. B. S.; BLOWER, S. M. Impact of antivirals and emergence of drug resistance: HSV-2 epidemic control.

- Aids Patient Care STDS, v. 14, n. 3, p. 133-42, 2000.
9. HILL, E. L.; HUNTER, G.; ELLIS, M. N. In vitro and in vivo characterization of herpes simplex virus clinical isolates recovered from patients with immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 35, p. 2322-8, 1991.
10. HIRSCH, M. S.; KAPLAN, J. C.; D'ÁQUILA, R.T. Antiviral agents. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; ROWLEY, P. *Virology*. 3. ed. Philadelphia: Raven Publishers, 1996. cap 3, p. 431-67.
11. KIMBERLIN, D. Herpes simplex virus, meningitis and encephalitis in neonates. *Herpes*, v. 2, suppl., p. 65-76, 2004.
12. MILLER, C. S. et al. The efficacy of valacyclovir in preventing recurrent herpes simplex virus infections associated with dental procedures. *J Am Dent Assoc*, v. 135, n. 9, p. 1311-8, 2004.
13. MIRANDA, M. M. F. S. et al. Víroses dermatrópicas. In: SANTOS, N. S. O. S.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. *Introdução à virologia humana*. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 7, p. 75-85.
14. MORFIN, F.; THOUVENOT, D. Herpes simplex resistance to antiviral drugs. *J Clin Virol*, v. 26, p. 29-37, 2003.
15. NAHMIAS, A. J.; LEE, F. K.; BECKMAN-NAHMIAS, S. Sero-epidemiological and sociological Patterns of Herpes Simplex Virus Infection in the World. *Scand J Infect Dis Suppl*, v. 69, p. 19-36, 1999.
16. NASCIMENTO, M. C. et al. Detection and direct typing of herpes simplex virus in perianal ulcers of patients with AIDS by PCR. *J Clin Microbiol*, v. 36, n. 3, p. 848-9, 1998.
17. ROIZMAN, B.; SEARS, A. Herpes simplex virus and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; ROWLEY, P. *Virology*. 3. ed. Philadelphia: Raven Publishers, 1996. cap 8, p. 2231-95.
18. SAFRIN, S.; ELBEIK, T.; MILLS, J. A rapid screen for in vitro susceptibility of clinical herpes simplex virus isolates. *J Infect Dis*, v. 169, p. 879-82, 1993.
19. SARISKY, R. T. et al. Difference in incidence of spontaneous mutations between herpes simplex virus type 1 and 2. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, n. 6, p. 1524-9, 2000.
20. SCOTT, D. A. et al. Detection of herpes simplex virus type 1 shedding in the oral cavity by polymerase chain reaction and enzyme linked immunosorbent assay at the prodromal stage of recrudescent herpes labialis. *J Oral Pathol Med*, v. 23, p. 305-9, 1997.
21. SKINNER, G. R. B. et al. A system for isolation, transport and storage of herpes simplex viruses. *J Virol Meth*, v. 65, p. 1-8, 1997.
22. SLOMKA, M. J. et al. A comparison of PCR with virus isolation and direct typing of genital herpes. *J Med Virol*, v. 55, p. 177-83, 1998.
23. WHITLEY, R. J. Herpes simplex viruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; ROWLEY, P. *Virology*. 3. ed. Philadelphia: Raven Publishers, 1996. cap 11, p. 2297-342.

Endereço para correspondência

Rafael B. Varella
Rua Andrade Neves, 269/203 – Tijuca
CEP 20510-230 – Rio de Janeiro-RJ
Tel.: (21) 2288-9262
e-mail: rafael_varella@hotmail.com