

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	<p>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 frequentemente 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 <i>vero</i>. 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 significativa 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.</p>
Cultura de célula	
PCR	
Transplante	

abstract

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.

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 MgCl, 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 MgCl, 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 Sequência de *primers* utilizados para mPCR e nmPCR

Técnica	Primer	Sequência (5'-3')	Gene alvo	Produto
mPCR	HSV1 P3-1	CCTCGCGTTCGTCCTGGTCCTCC	DNApol	469pb
	HSV1e 2 P5	ATGGTGAACATCGACATGTACGG	DNA-pol	-
	HSV2 P3-2	CCTCCTTGTCGAGGCCCGAAAC	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 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} ,

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

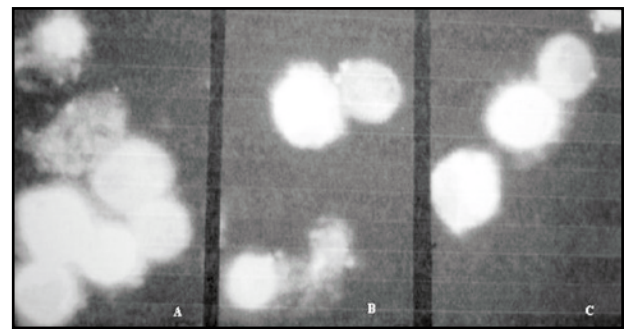


Figura 1

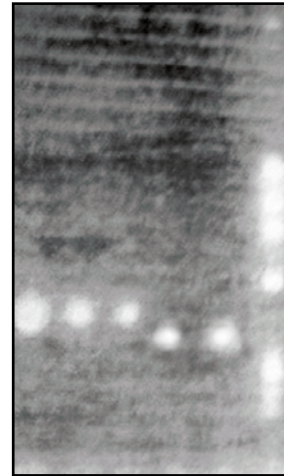


Figura 2

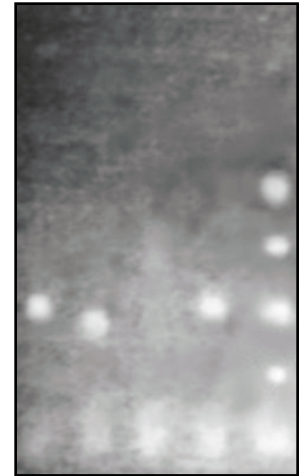


Figura 3

Tabela 2 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

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 comparamos 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. BOIVIN, 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 an 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. 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 dermatópicas. 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 recrudescence 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