

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Joseane Simone de Oliveira Pereira

**VIGILÂNCIA AMBIENTAL DOS POLIOVÍRUS, NO MUNICÍPIO DO RIO DE
JANEIRO, EM APOIO ÀS ATIVIDADES DE ERRADICAÇÃO GLOBAL DA
POLIOMIELITE.**

Rio de Janeiro

2013

Joseane Simone de Oliveira Pereira

**VIGILÂNCIA AMBIENTAL DOS POLIOVÍRUS, NO MUNICÍPIO DO RIO DE
JANEIRO, EM APOIO ÀS ATIVIDADES DE ERRADICAÇÃO GLOBAL DA
POLIOMIELITE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadores: Edson Elias da Silva
Eliane Veiga da Costa

Rio de Janeiro

2013

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Pereira , Joseane Simone de Oliveira

Vigilância ambiental dos poliovírus, no município do rio de janeiro, em apoio às atividades de erradicação global da poliomielite. / Joseane Simone de Oliveira Pereira. – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2013.

107 f. : il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2013.

Orientadores: Edson Elias da Silva e Eliane Veiga da Costa.

1. Poliomielite. 2. Erradicação de Doenças. 3. Poliovírus. 4. Vigilância Sanitária Ambiental. 5. Esgotos. I.Título.

Joseane Simone de Oliveira Pereira

VIGILÂNCIA AMBIENTAL DOS POLIOVÍRUS, NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO, EM APOIO ÀS ATIVIDADES DE ERRADICAÇÃO GLOBAL DA POLIOMIELITE.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em __/ __/ __.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fiocruz

Dra. Marize Pereira Miagostovich
Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Dra Adriana de Abreu Corrêa
Universidade Federal Fluminense

Dr. Edson Elias da Silva - Orientador
Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Dra. Eliane Veiga da Costa - Orientadora
Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Ao meu precioso Deus, que me formou e que tem me sustentado com Sua fidelidade e amor, dedico este trabalho.

Aos meus pais José Pereira e Maria Lucas de Oliveira Pereira, que me deram a vida e que sempre estiveram dispostos a apoiar os meus sonhos. E ao meu irmão Henrique, com quem pude compartilhar momentos alegres enquanto esteve conosco.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Edson Elias da Silva, pelo convite inicial e pela oportunidade, por ter confiado a mim a realização deste trabalho, que muito contribuiu para o meu crescimento profissional, pela paciência e disponibilidade em me atender nos momentos em que precisei.

À minha co-orientadora, Dra. Eliane Veiga da Costa, por ter aceitado o convite de co-orientar este trabalho, pelo carinho e paciência, por sua disponibilidade em sempre me ajudar, mesmo estando atarefada, suas portas sempre estiveram abertas para me socorrer. A conclusão deste trabalho tem a sua contribuição também. Obrigada!!!

À Fundação Oswaldo Cruz, pela oportunidade e conhecimentos adquiridos ao longo destes anos.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde pela oportunidade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Companhia Estadual de Águas e Esgotos (CEDAE) pelas coletas das amostras deste estudo. Em especial, nas pessoas do Sr. Paulo Afonso, Luciene, Sr. Jacó, Sr. Sérgio e Wanderson, agradeço a atenção e disponibilidade.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, pela oportunidade de ingresso. Às meninas da secretaria do curso, Sâmela e Raquel, por sua simpatia e atenção sempre dispensadas. A todos os colegas e docentes do Programa, pelo apoio, pelas aulas e esclarecimentos dados ao longo desses dois anos. À Dra. Ana Cristina Nogueira, pelo carinho, disponibilidade e atenção, enquanto estive à frente da coordenação. À Dra. Kátia Christina Leandro pela atenção dispensada.

À Plataforma Genômica – Sequenciamento de DNA - RPT01A- PDTIS/FIOCRUZ, pelo apoio técnico.

À Dr^a Adriana de Abreu Corrêa e Dr^a Marize Pereira Miagostovich por terem aceitado revisar este trabalho.

Aos antigos que passaram pelo LEV e com os quais pude compartilhar momentos engraçados: Aline Muzy, Aline Silva, Alex, Ana Paula, Bruna, Camila, Cátia, Diocreciano, Dolcy, Fernando, Gina, Hugo, Júlia Santos, Juliana, Júnior, Krysty, Laila, Larissa, Michele, Nathana, Paula, Rafaela, Renata Leal, Rita e Rosane. E a atual equipe: Amanda, Ericka, Elaine, Fernanda, Ivone, Jaqueline, Lidiane, Lívia, Silas, Stéphanie e Valdemar.

Ao Robson e Luiz da sala de esterilização, pelos bons momentos vividos. Como dei trabalho a vocês, sujava praticamente todas as vidrarias do laboratório com os meus experimentos. Agradeço o apoio prestado, a paciência, a atenção e por disponibilizarem sempre os materiais dos quais eu precisava para a execução deste trabalho. Obrigada pela grande ajuda!

Aos queridos colegas e amigos da Fiocruz que tive a oportunidade de conhecer ao longo destes anos: Ângela, Cláudia Flores, Eliane Nascimento, Ericka, Fernanda, Gabriela Pinto, Germano, Jaciara, Jaqueline, Leila, Lilian, Manoel, Marli, Monique, Murilos, Nieli, Paulo, Patrícia, Renata, Rosa, Silvana, Suelen, Tânia, Thereza, Valnice, Victor e Xênia.

Aos meus pais, José Pereira (*in memoriam*) e Maria, pelo amor, dedicação, ensinamentos, correções, paciência e incentivo a prosseguir sempre em busca dos meus objetivos. Mãe, obrigada por me assistir sempre nas horas em que eu mais preciso e também pelos lanchinhos e água nas madrugadas, enquanto estudava ou confeccionava este trabalho. Pai, embora não esteja mais aqui, sou grata pela paciência, conselhos, longas conversas e por ter sido a minha referência de honestidade, responsabilidade, caráter e respeito. Agradeço a Deus, na verdade, pelo privilégio de ser sua filha.

Ao meu irmão Henrique, que mesmo no seu mundo especial, nos contagiava com sua alegria.

À tia Vera, pelo carinho, atenção e incentivo.

Aos meus primos: Alexandre, Christiane, Cláudia, Elane, Eliane, Jorge Luiz e Pedro, pelo incentivo.

Às minhas tias Celina e Odila, pelo carinho que sempre tiveram. Aos tios: Ana, Carmen, Davi (*in memoriam*), Dodô, João, Maria (*in memoriam*), Noemi, Ozéas, José Lucas, Rute e Vera Lúcia, por suas orações e apoio.

Aos meus alunos e colegas do Ciep Asa Branca, em especial a minha coordenadora Adriana, por seu carinho, paciência, e por ajustar sempre o meu horário da melhor forma possível e pelo exemplo de liderança.

Ao meu querido Deus que me sustenta a cada dia com Sua fidelidade e amor e que se dispõe a ouvir o meu clamor, fazendo-me superar cada dificuldade em todos os instantes. A Ti, toda honra e toda a glória!

*Não é a montanha que conquistamos,
é a nós mesmos.*

Sir Edmund Hillary.

*O SENHOR Deus é a minha fortaleza,
e faz os meus pés como os da corça, e
me faz andar altaneiramente.*

Habacuque 3:19

*Os montes te veem e se contorcem;
passam torrentes de água; as
profundezas do mar fazem ouvir a sua
voz e levantam bem alto as suas mãos.
(...) O seu resplendor é como a luz,
raios brilham da sua mão; e ali está
velado o seu poder.*

Habacuque 3:4, 10.

RESUMO

A poliomielite é uma infecção causada por um dos três sorotipos de poliovírus (sorotipos 1, 2 e 3) e teve sua incidência diminuída drasticamente (>99%) pelo programa de erradicação global da doença, iniciado em 1988. Atualmente, estes vírus permanecem endêmicos em três países e casos de re-emergência por importação têm sido relatados em países livres da doença. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer a vigilância ambiental pelo isolamento e caracterização molecular dos poliovírus e enterovírus não-pólio circulantes, a partir de amostras de esgoto coletadas na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Alegria/Cedae, localizada no município do Rio de Janeiro, no período de dezembro de 2011 a junho de 2012 e de setembro a dezembro de 2012. Diferentes métodos de concentração viral foram avaliados (separação em duas fases; precipitação por polietilenoglicol (PEG) e adsorção por sílica) e 31 amostras foram coletadas durante o estudo. O isolamento em culturas de células RD e L20B, seguido de RT-PCR foi capaz de detectar enterovírus em 87% das amostras (27/31). Poliovírus foram isolados em 29,6 % (8/27), sendo Sabin 1 - n= 1; Sabin 2 - n= 5 e Sabin 3 - n= 2, enquanto que os demais isolados foram identificados como enterovírus não-pólio. Todos os poliovírus isolados foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico completo do gene VP1 e apresentaram mutações sinônimas e não-sinônimas, sendo algumas em aminoácidos específicos relacionados ao fenótipo atenuado. Todavia, não apresentaram mutações suficientes para serem caracterizados como poliovírus derivado da vacina (PVDV), sendo, portanto, classificados como vacinais ou *Sabin like*. Pela análise do sequenciamento nucleotídico parcial do gene VP1, os enterovírus não-pólio identificados foram: 1 Echovírus 3; 11 Echovírus 6; 7 Echovírus 7; 2 Echovírus 20; 4 Coxsackievírus B4 e 2 Coxsackievírus B5. A vigilância ambiental tem sido utilizada com sucesso no monitoramento da circulação de enterovírus e é de crucial importância nos estágios finais do programa de erradicação global da poliomielite da Organização Mundial da Saúde (OMS). Estes resultados demonstram a contínua circulação de poliovírus *Sabin like* e de enterovírus não-pólio na área analisada no período do estudo.

Palavras-chave: Poliomielite. Erradicação de Doenças. Poliovírus. Vigilância Sanitária Ambiental. Esgotos.

ABSTRACT

Poliomyelitis is an infection caused by one of three poliovirus serotypes (serotypes 1, 2 and 3) and its incidence decreased dramatically (> 99%) by the global polio eradication initiative, started in 1988. Currently, wild polioviruses remain endemic in three countries and cases of re-emergence by import of these viruses have been related in countries free of the disease. This study aimed to establish the environmental surveillance by the isolation and molecular characterization of circulating poliovirus and non-polio enteroviruses from wastewater samples collected at the Station of Sewage Treatment Alegria/ Cedae, located in Rio de Janeiro city, in the period from December 2011 to June 2012 and from September to December 2012. Different methods of viral concentration were evaluated (two-phases separate, polyethylene glycol (PEG) precipitation and silica adsorption) and 31 samples were collected during the study. The isolation in cell cultures RD and L20B, followed by RT-PCR was able to detect enteroviruses in 87% samples (27/31). Poliovirus was isolated in 29.6% samples (8/27) being Sabin1 - n= 1, Sabin 2 - n= 5 and Sabin 3 - n= 2, while the remaining isolates were non-polio enteroviruses. All poliovirus isolates were subjected to complete nucleotide sequencing of the VP1 gene and presented non-synonymous and synonymous mutations, being some mutations in specific amino acids related to the attenuated phenotype. However, showed no sufficient mutations for to be characterized like vaccine-derived poliovirus (VDPV), being classified as vaccine or Sabin like poliovirus. By the partial nucleotide sequencing of the VP1 gene analysis, the non-polio enteroviruses have been identified: 1 Echovirus 3; 11 Echovirus 6, 7 Echovirus 7, 2 Echovirus 20; 4 Coxsackievirus B4 and 2 Coxsackievirus B5. Environmental surveillance has been utilized successfully in monitoring the circulation of enterovirus and it is of crucial importance in the final stages of the global eradication initiative of polio by World Health Organization (WHO). These results show the continuous circulation of Sabin like poliovirus and non-polio enteroviruses in the analyzed area during the study period.

Keywords: Poliomyelitis. Disease Eradication. Poliovirus. Environmental Health Surveillance. Sewage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do genoma dos poliovírus e processamento da poliproteína.....	28
Figura 2 - Estrutura do capsídeo viral e disposição das proteínas estruturais.	29
Figura 3 - Ciclo replicativo dos poliovírus.	31
Figura 4 - Patogênese dos Enterovírus.	33
Figura 5 - Estrutura anatômica ilustrativa de corte transversal da medula espinhal. .	37
Figura 6 - Distribuição geográfica da circulação de cPVDV entre 2000 e 2013.	46
Figura 7 - Esquema de vacinação sequencial VIP/VOP de acordo com idade e vacina recomendada.	51
Figura 8 - Fluxograma do processamento das amostras no laboratório.....	60
Figura 9 - Fotos de satélite da cidade do Rio de Janeiro, apresentando os bairros beneficiados pela Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Alegria e sua localização no município do Rio de Janeiro.	62
Figura 10 - Visualização panorâmica da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Alegria. Local de coleta das amostras (afluente de entrada).....	63
Figura 11 - Perfil eletroforético dos produtos amplificados por RT-PCR em gel de poliacrilamida a 10% para a identificação do gênero <i>Enterovirus</i> (153 pb).....	88
Figura 12 - Perfil eletroforético dos produtos amplificados por RT-PCR em gel de poliacrilamida a 10% para identificação de poliovírus (79 pb).	89
Figura 13 - Perfis eletroforéticos dos produtos amplificados por RT-PCR em gel de poliacrilamida a 10% para identificação do Sorotipo 1 (70 pb); Sorotipo 2 (79 pb) e Sorotipo 3 (140 pb) de poliovírus.	90
Figura 14 - Perfis eletroforéticos dos produtos amplificados por RT-PCR em gel de poliacrilamida a 10% para caracterização intratípica dos poliovírus: Sabin 1 (97 pb); Sabin 2 (71 pb) e Sabin 3 (53 pb).	91
Figura 15 - Perfil eletroforético dos produtos amplificados por PCR em gel de agarose a 1%, para caracterização molecular dos poliovírus (1100 pb).	92
Figura 16 - Perfil eletroforético dos produtos amplificados por PCR em gel de agarose a 1%, para identificação dos enterovírus não-pólio (357 pb).....	95
Figura 17 - Frequência absoluta do número de enterovírus isolados em relação ao número total de detecções.	97

Figura 18 - Distribuição mensal dos sorotipos de PV e EVNP no período de dezembro/2011 a junho/2012 e setembro/2012 a dezembro/2012.98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Recuperação de PV1 Sabin utilizando diferentes metodologias de concentração viral.	85
Tabela 2 - Positividade por isolamento das amostras concentradas pelos três métodos de concentração testados simultaneamente.	86
Tabela 3 - Detecção de enterovírus por método de concentração viral utilizado.	87
Tabela 4 - Isolamento viral em linhagens de células RD e L20B.	87
Tabela 5 - Mutações nucleotídicas e substituições de aminoácidos identificados no gene VP1 dos poliovírus isolados em relação à cepa vacinal padrão.....	94
Tabela 6 - Sorotipos isolados de PV e EVNP por amostra no período do estudo.	99

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos Enterovírus associados a infecções humanas baseada na análise filogenética de diferentes genomas virais.26

Quadro 2 - Manifestações clínicas mais comuns causadas por enterovírus não-pólio.36

Quadro 3 - Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR, PCR e de sequenciamento nucleotídico e sua posição de anelamento no genoma viral.83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
BA	Baboon enterovírus
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
cPVDV	Poliovírus derivado da vacina ou vacinal circulante
Cedae	Companhia Estadual de Águas e Esgotos
CV	Coxsackievírus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ddNTP	Dideoxynucleosídeo trifosfato
dNTP	Deoxynucleotídeo trifosfato
DTT	Di-Thio-Treitol
E	Echovírus
ECP	Efeito citopático ou citopatogênico
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
EV	Enterovírus
EVNP	Enterovírus não-pólio
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
g	Grama
GPEI	<i>Global Polio Eradication Initiative</i> (Iniciativa de Erradicação Global da Pólio)
HCl	Ácido clorídrico
HRV-A	Rinovírus humano A
HRV-B	Rinovírus humano B
HRV-C	Rinovírus humano C
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IRES	<i>International Ribosome Entry Site</i> (sítio de entrada no ribossomo)

ITD	<i>Intratypic differentiation of poliovirus isolates</i> (diferenciação intratípica dos poliovírus isolados)
L20B	Células L de camundongo geneticamente modificadas que expressam um receptor humano para Poliovírus
LEV	Laboratório de Enterovírus
M	Concentração molar
MEM	Meio essencial mínimo
min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Concentração milimolar
N	Concentração normal
NaCl	Cloreto de sódio
NCR	<i>Non-coding region</i> (região não-codificante)
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Controls</i> (Instituto Nacional de Padrões e Controlos Biológicos)
NaOH	Hidróxido de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
nt	Nucleotídeo
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Panamericana da Saúde
ORF	<i>Open reading frame</i> (fase de leitura aberta)
pb	Pares de bases
PAI	Programa Ampliado de Imunizações
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato-salina)
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PFA	Paralisia Flácida Aguda
pH	Potencial hidrogeniônico
pmoles	Picomoles
PV	Poliovírus
PVDV	Poliovírus derivado da vacina ou vacinal

RD	Células de rhabdomiosarcoma embrionário humano
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase
s	Segundo
SA5	Simian enterovírus A5
SiO ₂	Dióxido de silício
SV	Simian enterovírus
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TCID ₅₀	<i>Tissue culture infective dose 50%</i> (50% da Dose infectante em cultura de células).
tVOP	Vacina oral atenuada contra a poliomielite trivalente
U	Unidade
U/mL	Unidade por mililitro
V	Volts
VAPP	Poliomielite associada ao vírus vacinal ou poliomielite pós-vacinal
VIP	Vacina inativada contra a poliomielite
VOP	Vacina oral atenuada contra a poliomielite
VP1	Proteína estrutural 1
VPg	<i>Virion protein genome linked</i> (Proteína viral G ligada à região 5'NC)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS POLIOVÍRUS.....	24
1.1.1 Classificação	24
1.1.2 Estrutura do genoma e biossíntese viral	27
1.1.3 Propriedades físico-químicas	32
1.1.4 Patogenia	32
1.2 ENTEROVÍRUS NÃO-PÓLIO.....	35
1.3 POLIOMIELITE	37
1.3.1 Poliomielite no Brasil	39
1.4 VACINAS CONTRA A POLIOMIELITE	41
1.4.1 Vacina inativada contra a poliomielite (VIP)	41
1.4.2 Vacina oral atenuada contra poliomielite (VOP)	42
1.4.2.1 <i>Poliomielite associada ao vírus vacinal (VAAP)</i>	43
1.4.2.2 <i>Poliovírus derivados da vacina (PVDV)</i>	44
1.5 PROGRAMA DE ERRADICAÇÃO GLOBAL DA POLIOMIELITE	46
1.5.1 Calendário de Vacinação no Brasil.....	50
1.6 DIREITO E AÇÕES DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE	52
1.6.1 Vigilância das Paralisias Flácidas Agudas	54
1.6.2 Vigilância Ambiental dos poliovírus	54
2 JUSTIFICATIVA	57
3 OBJETIVOS	58
3.1 OBJETIVO GERAL.....	58
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
4 MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL	59
4.2 ÁREA DE ESTUDO.....	61
4.2.1 Amostras de águas residuárias	62
4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS.....	64
4.3.1 Concentração das amostras.....	64
4.3.1.1 <i>Método de separação em duas fases</i>	66
4.3.1.2 <i>Método de precipitação por PEG</i>	67
4.3.1.3 <i>Método de adsorção por sílica</i>	68

4.3.2 Culturas Celulares	69
4.3.2.1 Isolamento viral em culturas celulares.....	70
4.3.3 Identificação dos vírus isolados por RT-PCR	70
4.3.3.1 Identificação dos enterovírus por RT-PCR PAN-EV.....	70
4.3.3.2 Visualização dos produtos amplificados por eletroforese em gel de poliacrilamida	72
4.3.3.3 Identificação dos poliovírus por RT-PCR PAN-PV	72
4.3.3.4 Identificação dos sorotipos dos poliovírus por RT-PCR Sorotipagem	73
4.3.3.5 Caracterização intratípica por RT-PCR Sabin	74
4.3.4 Caracterização molecular dos poliovírus e enterovírus não-pólio circulantes ..	76
4.3.4.1 Extração do RNA viral	76
4.3.4.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)	76
4.3.4.3 Reação de PCR para amplificação parcial do gene VP1 do genoma dos enterovírus não-pólio.....	77
4.3.4.4 Reação de PCR para amplificação total do gene VP1 do genoma dos poliovírus.....	77
4.3.4.5 Visualização dos produtos amplificados por eletroforese em gel de agarose	78
4.3.4.6 Purificação do DNA	78
4.3.4.7 Quantificação do concentrado de DNA dos produtos da PCR	79
4.3.4.8 Sequenciamento dos produtos da PCR	80
4.3.4.9 Reações de sequenciamento dos produtos amplificados dos enterovírus não-pólio.....	80
4.3.4.10 Reações de sequenciamento dos produtos amplificados dos poliovírus.....	81
4.3.4.11 Purificação dos produtos da reação de sequenciamento	81
4.3.4.12 Sequenciamento e análise das sequências obtidas	81
4.3.5 Iniciadores utilizados na reação de RT-PCR, PCR e sequenciamento nucleotídico	83
5 RESULTADOS.....	84
5.1 AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DAS METODOLOGIAS DE CONCENTRAÇÃO VIRAL.....	84
5.2 ANÁLISE DOS MÉTODOS NO CAMPO	86
5.3 MONITORAMENTO DOS VÍRUS CIRCULANTES	86
5.4 ISOLAMENTO VIRAL EM CULTURAS CELULARES.....	87

5.5 IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROVÍRUS DENTRE OS VÍRUS ISOLADOS	88
5.6 IDENTIFICAÇÃO DOS POLIOVÍRUS DENTRE OS ENTEROVÍRUS ISOLADOS	89
5.7 CARACTERIZAÇÃO INTRATÍPICA DOS SOROTIPOS DE POLIOVÍRUS	89
5.8 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS POLIOVÍRUS E ENTEROVÍRUS NÃO-PÓLIO CIRCULANTES	91
5.8.1 Caracterização dos poliovírus por sequenciamento completo do gene VP1	91
5.8.2 Caracterização dos enterovírus não-pólio por sequenciamento parcial do gene VP1.....	95
5.9 CARACTERIZAÇÃO DOS VÍRUS ISOLADOS	96
6. DISCUSSÃO	100
7 CONCLUSÕES	109
8 PERSPECTIVAS.....	110
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
ANEXO A - “3º TERMO ADITIVO AO ACORDO DE COOPERAÇÃO TÉCNICA CELEBRADO ENTRE A FIOCRUZ E CEDAE.”	127

1 INTRODUÇÃO

Para controlar e erradicar doenças é necessário detectar os agentes infecciosos que as causam. Algumas doenças produzem sintomas característicos e distintos que facilitam a sua vigilância. No entanto, outras podem se espalhar silenciosamente, com grandes períodos de latência entre exposição e sintomas, ou mesmo estes últimos ocorrendo em apenas uma fração de indivíduos infectados (GOURVILLE et al, 2006).

A erradicação da varíola, em 1977, demonstrou que é possível eliminar globalmente algumas doenças imunopreveníveis mediante programas de imunização em massa (FENNER, 1988 apud NOMOTO; ARITA, 2002). Para uma doença ser considerada erradicável, além da existência de vacinas seguras e eficazes, não deve apresentar outros reservatórios senão o homem. Seus agentes etiológicos, portanto, não devem sobreviver por longos períodos no ambiente e devem ser capazes de induzir a uma resposta imune prolongada no hospedeiro humano. Por atender a esses requisitos, a poliomielite tem sido considerada uma doença candidata à erradicação (MMWR, 1993).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a poliomielite (poliomielite anterior aguda, paralisia infantil) é uma doença viral infecto-contagiosa, que afeta principalmente crianças abaixo de cinco anos de idade, caracterizada por um quadro de paralisia flácida, de início súbito (WHO, 2004). Por apresentar somente o homem como hospedeiro natural, a poliomielite pode ser controlada por meio de programas de imunização (NOMOTO; ARITA, 2002).

A poliomielite é causada por um dos três sorotipos de poliovírus: poliovírus 1 (PV1), poliovírus 2 (PV2) e poliovírus 3 (PV3) (PALLANSCH; ROOS, 2001; RACANIELLO, 2001). Membro da ordem *Picornavirales*, família *Picornaviridae* e gênero *Enterovirus*, o poliovírus foi o enterovírus mais estudado e forneceu informações importantes sobre a biologia dos Picornavírus (PALLANSCH; ROOS, 2001).

Em 1988, a Assembleia Mundial de Saúde da OMS iniciou a Iniciativa de Erradicação Global da Poliomielite (*Global Polio Eradication Initiative*, GPEI), com o propósito de erradicar globalmente essa doença até o ano 2000 (WHO, 1988). Para este propósito, foram traçadas duas estratégias básicas: campanhas de imunização

em massa, utilizando a vacina oral contra a poliomielite (VOP) e atividades de vigilância epidemiológica e laboratorial dos poliovírus (HULL et al, 1994).

Embora a erradicação não tenha sido ainda alcançada, o programa já atingiu uma redução global de mais de 99% na incidência de transmissão de poliovírus selvagens. Atualmente, apenas três países são considerados endêmicos: Nigéria, Paquistão e Afeganistão. Todavia, casos de re-emergência de poliovírus selvagens, importados de países endêmicos, foram relatados em anos anteriores (GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2013a).

Neste processo de erradicação, a VOP teve um papel fundamental, tanto pela facilidade de sua administração, favorecendo altas taxas de cobertura vacinal, bem como pela maior disseminação do vírus vacinal pela via fecal-oral (CARVALHO; WECKX, 2006). Todavia, por ser geneticamente instável, os poliovírus atenuados presentes na VOP têm sido associados a alguns eventos adversos, tais como casos de poliomielite associada ao vírus vacinal ou poliomielite pós-vacinal (VAAP). Os vírus vacinais também podem sofrer mutações dando origem aos poliovírus derivados da vacina (PVDV) (KEW et al, 2005).

A eficiência da erradicação global da poliomielite depende da vigilância efetiva de poliovírus nos casos clínicos de paralisias flácidas agudas (PFA). A vigilância de PFAs consiste na notificação e investigação cuidadosa dos casos, com coleta de amostras de fezes de pacientes sintomáticos e seus contatos, quando necessário, e na análise virológica das amostras em laboratórios credenciados à rede global de laboratórios da OMS (HOVI, 2006). Sabe-se que apenas 1% dos indivíduos infectados por poliovírus desenvolvem a paralisia (HOVI et al, 2012). Por esta razão, a circulação de poliovírus selvagens e/ou PVDV pode não ser detectada devido à existência de casos assintomáticos. Para suprir esta limitação, faz-se necessária uma vigilância ambiental dos poliovírus.

Em 2010, a OMS incluiu, no Plano Estratégico da Iniciativa de Erradicação Global da Pólio 2010-2012, a vigilância ambiental dos poliovírus como uma ferramenta suplementar à vigilância de casos de PFA (WHO, 2010). Dessa forma é possível monitorar a circulação de poliovírus selvagens e/ou PVDV em amostras ambientais supostamente contaminadas por fezes humanas, mesmo na ausência de casos de PFA (HOVI, 2006; HOVI et al, 2012).

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS POLIOVÍRUS

Relatos antigos mostram que doenças causadas por enterovírus já eram conhecidas e haviam sido descritas antes mesmo de seus agentes virais terem sido identificados (PALLANSCH; ROOS, 2001).

A história dos enterovírus está extremamente relacionada com a história dos poliovírus, visto que o estudo destes é um marco não somente para os estudos a respeito do gênero *Enterovirus*, mas também para toda a virologia (PALLANSCH; ROOS, 2001, DA SILVA; AZEVEDO; COSTA, 2005)

Embora tenha sido caracterizado 50 anos após a sua descoberta, o vírus da poliomielite foi o primeiro enterovírus a ser reconhecido e serviu como protótipo para todos os outros vírus (WIMMER et al, 1993; MELNICK, 1996).

A pesquisa envolvendo o poliovírus representou um impacto significativo na virologia molecular. O poliovírus foi o primeiro vírus a ser propagado em culturas de linhagens de células e a ter seu genoma completamente clonado e sequenciado, além de ter sido o primeiro vírus a ter sua estrutura determinada por cristalografia (PALLANSCH; ROOS, 2001).

1.1.1 Classificação

Os poliovírus pertencem à ordem *Picornavirales* (*pico*=pequeno; *rna*= ácido ribonucleico), família *Picornaviridae* e gênero *Enterovirus* (KNOWLES et al, 2012; THE PICORNAVIRUS PAGE).

De acordo com a atual classificação taxonômica dos vírus, oficializada em 2012 pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV*), a família *Picornaviridae* compreende 17 gêneros: *Aphthovirus* (4 espécies), *Aquamavirus* (1 espécie), *Avihepatovirus* (1 espécie), *Cardiovirus* (2 espécies), *Cosavirus* (1 espécie), *Dicipivirus* (1 espécie), *Enterovirus* (12 espécies), *Erbovirus* (1 espécie), *Hepatovirus* (1 espécie), *Kobuvirus* (3 espécies), *Megrivirus* (1 espécie), *Parechovirus* (2 espécies), *Salivirus* (1 espécie), *Sapelovirus* (3 espécies), *Senecavirus* (1 espécie), *Teschovirus* (1 espécie) e *Tremovirus* (1 espécie) (KNOWLES et al, 2012; INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES).

O gênero *Enterovirus* está subdividido em 12 espécies, de acordo com as suas propriedades moleculares e antigênicas (KNOWLES et al, 2012; INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES; THE PICORNAVIRUS PAGE). Inicialmente, foram denominados de acordo com a identificação das espécies de hospedeiros nos quais foram primeiramente isolados. Entretanto, podem ser isolados em outros hospedeiros e a maioria das espécies de enterovírus que infectam humanos contêm sorotipos isolados de primatas não humanos. Por esse motivo, na classificação atual das espécies de enterovirus, os nomes dos hospedeiros foram retirados (THE PICORNAVIRUS PAGE).

As espécies de enterovírus que infectam o homem, anteriormente chamadas de *Human enterovirus A*, *Human enterovirus B*, *Human enterovirus C* e *Human enterovirus D*, receberam uma nova designação por apresentarem outros hospedeiros, além do homem. São agora designadas como, respectivamente: *Enterovirus A*, *Enterovirus B*, *Enterovirus C* e *Enterovirus D* (KNOWLES et al, 2012; INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES; THE PICORNAVIRUS PAGE). O **Quadro 1** mostra a atual classificação dos enterovírus que infectam o homem, baseada na análise filogenética de diferentes genomas virais.

Quadro 1 - Classificação dos Enterovírus associados a infecções humanas baseada na análise filogenética de diferentes genomas virais.

Enterovírus A	Enterovírus B	Enterovírus C	Enterovírus D	Rinovírus A	Rinovírus B	Rinovírus C
Coxsackievírus	Coxsackievírus	Poliovírus	Enterovírus	Rinovírus humano A (HRV - A)	Rinovírus humano B (HRV - B)	Rinovírus humano C (HRV - C)
CV-A2 - A8	CV-B1 - B4	PV-1	EV-D68			
CV-A10	CV-B5 (incl. SVDV)	PV-2	EV-D70	HRV-A1 - A2	HRV-B3 - B6	HRV-C1 - C51
CV-A12	CV-B6	PV-3	EV-D94	HRV-A7 - A13	HRV-B14	
CV-A14	CV-A9		EV-D111	HRV-A15 - A16	HRV-B17	
CV-A16		Coxsackievírus	EV-D120	HRV-A18 - A25	HRV-B26 - B27	
	Echovírus	CV-A1		HRV-A28 - A34	HRV-B35	
Enterovírus	E-1 (incl. E-8)	CV-A11		HRV-A36	HRV-B37	
EV-A71	E-2 - E-7	CV-A13		HRV-A38 - A41	HRV-B42	
EV-A76	E-9 (incl. CV-A23)	CV-A17		HRV-A43 - A47	HRV-B48	
EV-A89 - A91	E-11 - E-21	CV-A19		HRV-A49 - A51	HRV-B52	
EV-114	E-24 - E-27	CV-A20 - A22		HRV-A53 - A68	HRV-B69 - B70	
EV-A119	E-29 - E-33	CV-A24		HRV-A71	HRV-B72	
				HRV-A73 - A78	HRV-B79	
Simian enterovírus	Enterovírus	EV-C95 - C96		HRV-A80 - A82	HRV-B83 - B84	
SV-19	EV-B69	EV-C99		HRV-A85	HRV-B86	
SV-43	EV-B73 - B75	EV-C102		HRV-A88 - A90	HRV-B91 - B93	
SV-49	EV-B77 - B88	EV-C104 - C105		HRV-A94 - A96	HRV-B97	
EV-A92	EV-B93	EV-C109		HRV-A98	HRV-B99	
	EV-B97 - B98	EV-C113		HRV-A100 - A103		
Baboon enterovírus A-13 (BA-A13)	EV-B100 - B101	EV-C116 - C118				
	EV-B106 - B107					
	EV-B110					
	SA5					

Fonte: INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES; THE PICORNAVIRUS PAGE.

CV- Coxsackievírus; EV- Enterovírus; SV- Simian enterovírus; BA- Baboon enterovírus; E- Echovírus; SA5- Simian enterovírus A5; PV- Poliovírus; HRV-A- Rinovírus humano A; HRV-B- Rinovírus humano B; HRV-C- Rinovírus humano C; incl.- incluído.

1.1.2 Estrutura do genoma e biossíntese viral

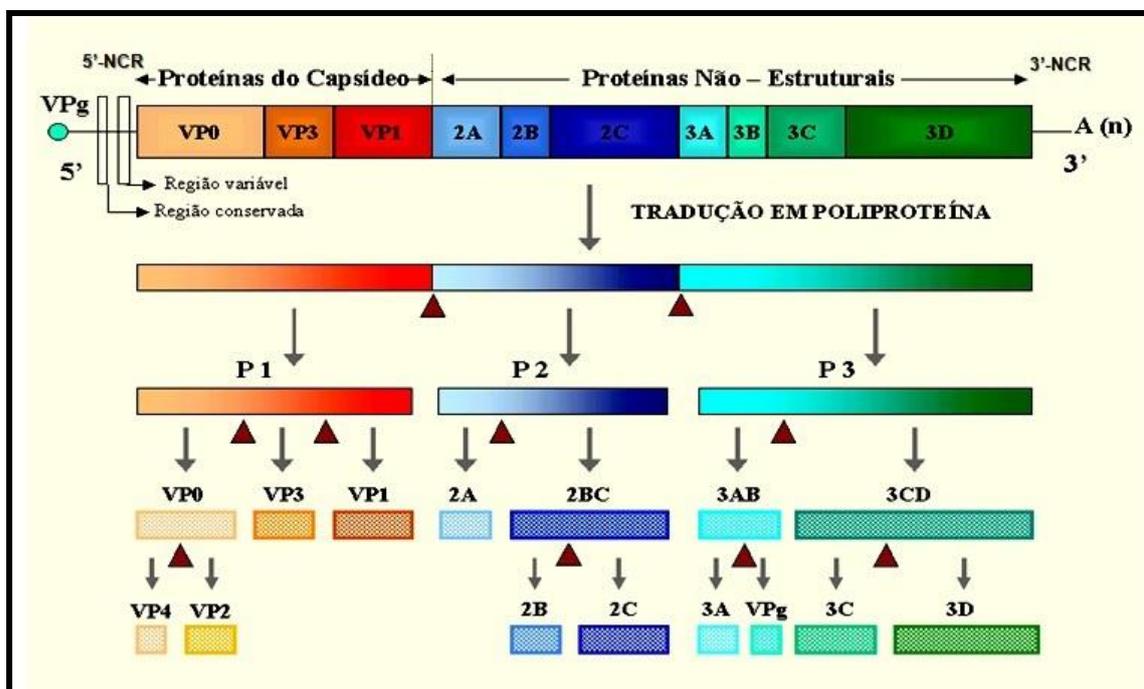
Os poliovírus são vírus pequenos, esféricos e não-envelopados, medindo aproximadamente 30 nm de diâmetro (RACANIELLO, 2001; WIMMER; HELLEN; CAO, 1993).

O genoma viral é composto de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, polaridade positiva e peso molecular de $2,6 \times 10^6$ Daltons (aproximadamente 7.500 nucleotídeos). Apresenta uma cauda poli-A ligada covalentemente à região 3' não-codificante (3'NCR) e uma proteína (*Virion protein genome linked* - VPg) ligada à região 5' não-codificante (5'NC) (NOMOTO; ARITA, 2002).

A região 5'NCR, com cerca de 740 nucleotídeos (nt), precede a fase de leitura aberta (*Open Reading Frame* - ORF). Nesta região está localizado o sítio de entrada no ribossomo (*International Ribosome Entry Site* - IRES), responsável por direcionar a tradução do RNA viral (WIMMER; HELLEN; CAO, 1993). O IRES consiste em um elemento regulatório de 450-600 nt, contendo vários códons de iniciação AUG, onde se tem o início da tradução do RNA viral (WIMMER; HELLEN; CAO, 1993).

O RNA viral funciona como RNA mensageiro e codifica uma poliproteína, a qual é clivada em três regiões (P1, P2 e P3), para produzir as proteínas virais (estruturais e não estruturais) importantes na replicação do vírus. As clivagens são realizadas por proteínas codificadas pelo próprio vírus, gerando diversos produtos proteicos, como: proteases, RNA polimerases e as proteínas de capsídeo (RACANIELLO, 2001; DA SILVA; AZEVEDO; COSTA, 2005). A **Figura 1** ilustra o genoma dos poliovírus e o processamento da poliproteína.

Figura 1 - Estrutura do genoma dos poliovírus e processamento da poliproteína.

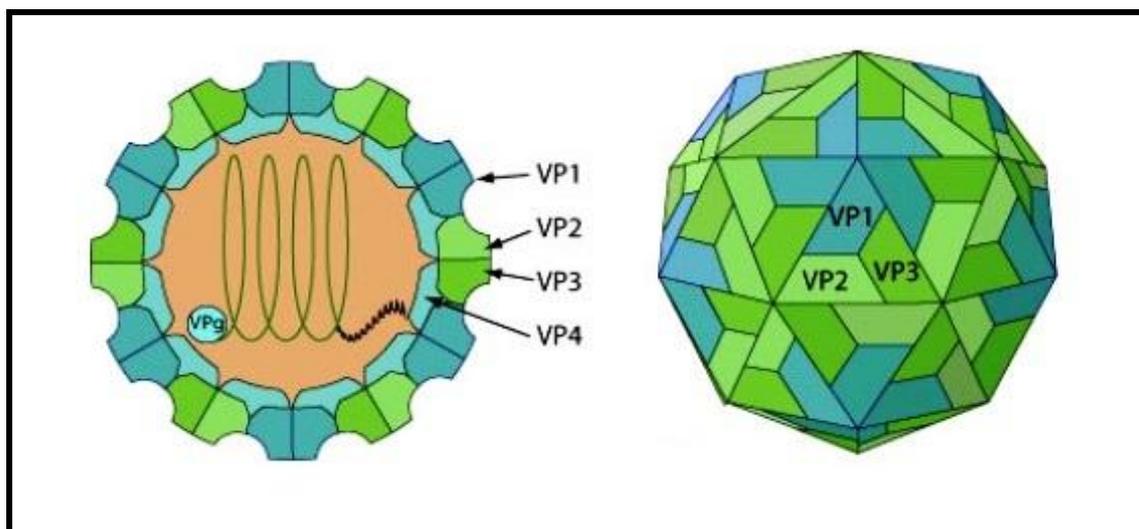


Fonte: Adaptação de COSTA, 1999.

Esquema ilustrativo do genoma dos poliovírus. VP0, VP1, VP2, VP3 e VP4: proteínas estruturais que compõem o capsídeo viral. VPg: proteína viral G ligada à 5'-NCR. P1, P2, P3: precursores proteicos. 2A, 2B, 2C, 3A, 3C, 3D: proteínas não estruturais (proteases e RNA polimerase). 5'-NCR: região 5' não-codificante. 3'-NCR: região 3' não-codificante. Parte superior do esquema: RNA viral, com a proteína VPg ligada à terminação 5' do genoma e à 5'-NCR; a região codificadora de proteínas estruturais e não estruturais (VP0 - 3D); 3'-NCR e o terminal poliadenilado [A(n)]. Parte inferior do esquema: mostra a sequência de clivagens da poliproteína. Poliproteína é dividida em três segmentos: P1, P2 e P3, separadas por clivagem nascente por duas proteinases virais 2A e 3C. Indicados produtos intermediários e finais da clivagem. Clivagem de VP0, separando em VP4 e VP2. Clivagens realizadas pelo 3C e seu precursor 3CD.

Acondicionado dentro de um capsídeo de simetria icosaédrica, o genoma viral é composto de 60 subunidades idênticas (protômeros), constituídas de quatro polipeptídeos ou proteínas estruturais, denominadas de VP1, VP2, VP3 e VP4, que são produtos de reações proteolíticas do segmento P1 (RACANIELLO, 2001). Os polipeptídeos VP1, VP2 e VP3, expostos na superfície do vírion, apresentam extensões formando sítios antigênicos indutores de anticorpos neutralizantes. O polipeptídeo VP4 fica internalizado e associado ao RNA viral (KITAMURA et al, 1981; WIMMER; HELLEN; CAO, 1993). A **Figura 2** ilustra a disposição das proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP4 que formam o capsídeo dos poliovírus.

Figura 2 - Estrutura do capsídeo viral e disposição das proteínas estruturais.



Fonte: VIRALZONE EXPASY. Acesso em 21/02/2013.

Esquema ilustrativo da disposição das proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP4 do capsídeo dos poliovírus. VP1, VP2, VP3 e VP4: proteínas estruturais do capsídeo viral. VP1, VP2 e VP3 estão expostas na superfície externa do vírion. VP4 está internalizada associada ao RNA viral.

O ciclo replicativo ocorre no citoplasma da célula do hospedeiro. Inicia-se no momento em que ocorre a interação vírus-célula, com a adsorção do vírion a receptores celulares específicos presentes na membrana plasmática (PALLANSCH; ROOS, 2001; RACANIELLO, 2001).

Após a adsorção, o vírus é então internalizado e tem seu capsídeo fragmentado. Após mudanças na estrutura do vírion, o RNA viral é transferido para o citosol, onde ocorre a sua replicação. (RACANIELLO, 2001).

O RNA, agindo como RNA mensageiro (RNAm), é automaticamente traduzido, sem interrupção, em uma única poliproteína que, ainda no processo de formação, é clivada autocataliticamente nos intermediários P1, P2 e P3 (RACANIELLO, 2001). O processamento da poliproteína precursora é realizado cotransducionalmente por reações intramoleculares (*in cis*), as quais são chamadas de clivagens primárias, seguidas pelo processamento secundário *in cis* ou *in trans* (intermolecular). O evento inicial na sequência de clivagens é a liberação do precursor P1 da poliproteína nascente pela protease 2A. A 2Apro é liberada da poliproteína por clivagem cotransducional na sua terminação amino. Esta clivagem é um pré-requisito para o processamento proteolítico da região

precursora do capsídeo. Já a 3Cpro é responsável pela clivagem primária entre 2C e 3A, separando os segmentos P2 e P3, e pela maioria das clivagens secundárias ocorridas nos intermediários P1, P2 e P3. A forma precursora 3CDpro parece catalisar eficientemente algumas clivagens ocorridas no segmento P1. O precursor P1 é clivado para produzir, inicialmente, VP0, VP1 e VP3 e, finalmente, as quatro proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP4. Os segmentos P2 e P3 são processados para darem origem às proteínas não estruturais envolvidas no processamento protéico (2Apro, 3Cpro, 3CDpro) e na replicação do genoma (2B, 2C, 3AB, 3BVPg, 3Dpol) (RACANIELLO, 2001).

A primeira etapa na replicação do RNA viral consiste em copiar o RNA genômico para formar uma fita complementar de polaridade negativa. Esta fita serve de molde para síntese de novas fitas de polaridade positiva. A síntese da fita complementar é iniciada na extremidade 3'NC do genoma viral e utiliza a proteína VPg como um iniciador. A partir de uma fita complementar de polaridade negativa, várias fitas nascentes de RNA com polaridade positiva são transcritas simultaneamente pela RNA polimerase viral, formando o chamado intermediário replicativo (RUECKERT, 1996; RACANIELLO, 2001; MURRAY; BARTON, 2003).

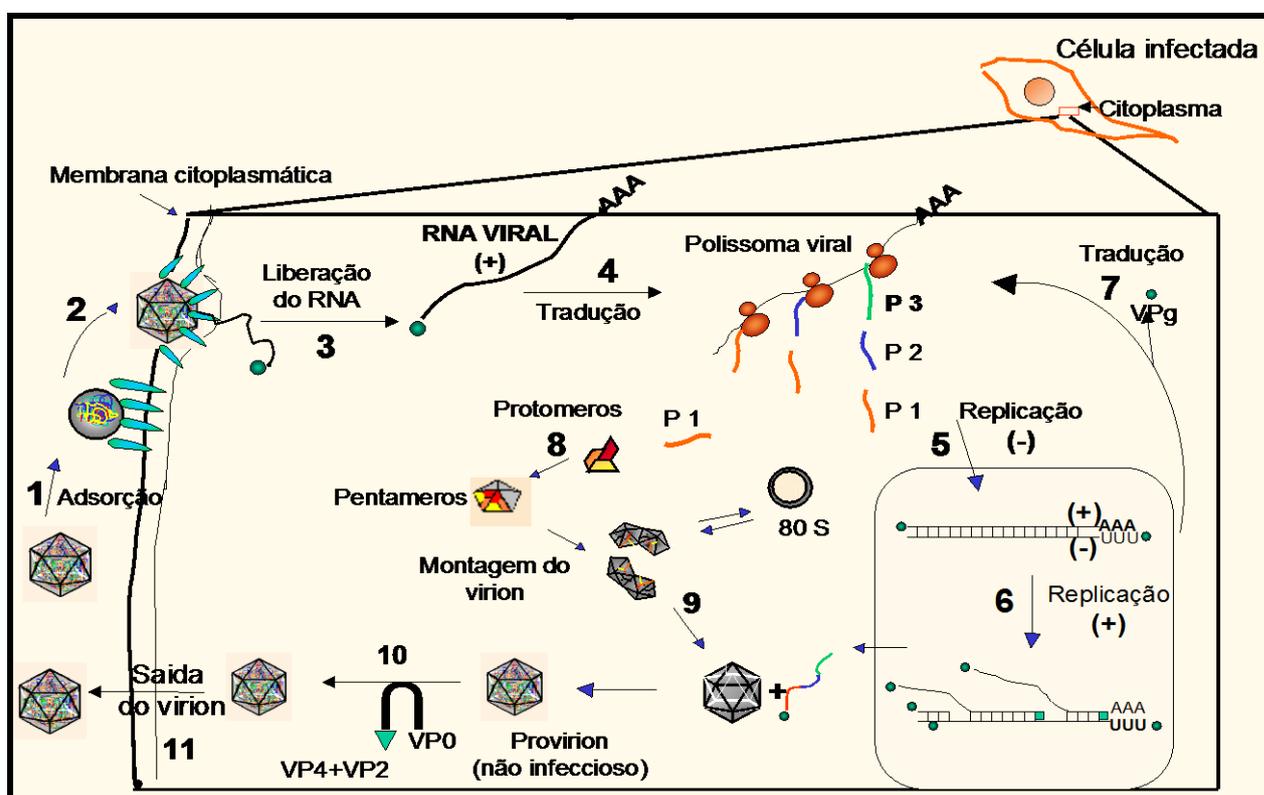
Ainda no início da replicação, parte do RNA positivo retorna ao citoplasma para a tradução de mais proteínas, enquanto outra parte permanece no retículo endoplasmático liso para a formação de mais centros de replicação de fita positiva. Posteriormente, as fitas positivas de RNA são acumuladas até serem empacotadas nos capsídeos. As partículas completas são liberadas pela desintegração da célula hospedeira (RUECKERT, 1996).

Similar ao que acontece em outros vírus de RNA, a RNA polimerase codificada pelo genoma viral não apresenta a propriedade de correção dos nucleotídeos inseridos erroneamente. Isto possibilita a acumulação de substituições ou mutações com alta frequência durante a replicação viral (ZURBRIGGEN et al, 2008). Estas mutações são categorizadas como sinônimas ou não-sinônimas. Mutações sinônimas ou silenciosas resultam na substituição de um nucleotídeo por outro, que leva à formação de um códon diferente, que continua, contudo, a codificar o aminoácido original, sem alteração na sequência dos aminoácidos e na função da proteína. As mutações não-sinônimas caracterizam-se pela substituição de nucleotídeos que resulta na formação de um

novo códon que codifica um aminoácido diferente, alterando a estrutura primária da proteína formada (ALBERTS et al, 2004).

A duração completa do ciclo de replicação, desde a infecção até a liberação do vírus, geralmente, varia de 5 a 10 horas, dependendo de alguns fatores, como: pH, temperatura, sorotipo viral, dose infectante da partícula viral e estado nutricional da célula hospedeira (MOORE; MORENS, 1984). Em condições ótimas, a biossíntese viral é capaz de produzir de 25.000 a 100.000 partículas virais por célula. Todavia, somente entre 0,1% e 10% são infecciosas (RACANIELLO, 2001). A **Figura 3** ilustra o esquema do ciclo replicativo dos poliovírus.

Figura 3 - Ciclo replicativo dos poliovírus.



Fonte: RUECKERT, 1985 adaptado por Costa (1999).

1- Adsorção; 2- Endocitose; 3- Liberação do RNA viral; 4- Tradução; 5,6- Replicação; 7- Tradução para novas proteínas; 8,9,10- Empacotamento do vírion; 11- Saída do vírion.

1.1.3 Propriedades físico-químicas

Os poliovírus, por não serem envelopados, são resistentes a clorofórmio e a outros solventes orgânicos, sendo relativamente estáveis em ambientes aquáticos à temperatura ambiente. Quando adsorvidos a partículas sólidas no ambiente, podem permanecer infecciosos por um período de até dois meses no esgoto dependendo dos fatores que levam a sua inativação, como luz solar, alta temperatura, pH extremo e outros fatores ambientais (BOTTIGER; HERRSTROM, 1992; POYRY; APOSTOL et al, 2012b; HOVI et al, 2012; STENVIK; HOVI, 1988 apud LODDER et al, 2012). Estes vírus podem ser inativados por outros agentes físicos e químicos, como: formaldeído a 0,3%; ácidos fortes, cloro residual livre (0,3 a 0,5 ppm), HCl (0,1N) e calor (50°C/60 minutos), os quais proporcionam uma rápida inativação. Os poliovírus resistem bem a enzimas proteolíticas, desinfetantes de uso comum (etanol a 70%, isopropanol e sais de amônio quaternário) e a solventes orgânicos, como o éter. Estes vírus são estáveis, em culturas celulares, por muitos anos a baixas temperaturas (-70 °C), por semanas quando a 4 °C e por dias à temperatura ambiente (MOORE; MORENS, 1984; MELNICK, 1996).

1.1.4 Patogenia

A porta de entrada dos poliovírus é a via oral através do trato respiratório superior, mais especificamente a orofaringe, sendo a transmissão predominantemente, por via fecal-oral, em países em desenvolvimento, através de água e alimentos contaminados por fezes, ou por via oral-oral, por meio de secreções de nasofaringe, nos países desenvolvidos (PALLANSCH; ROOS, 2001).

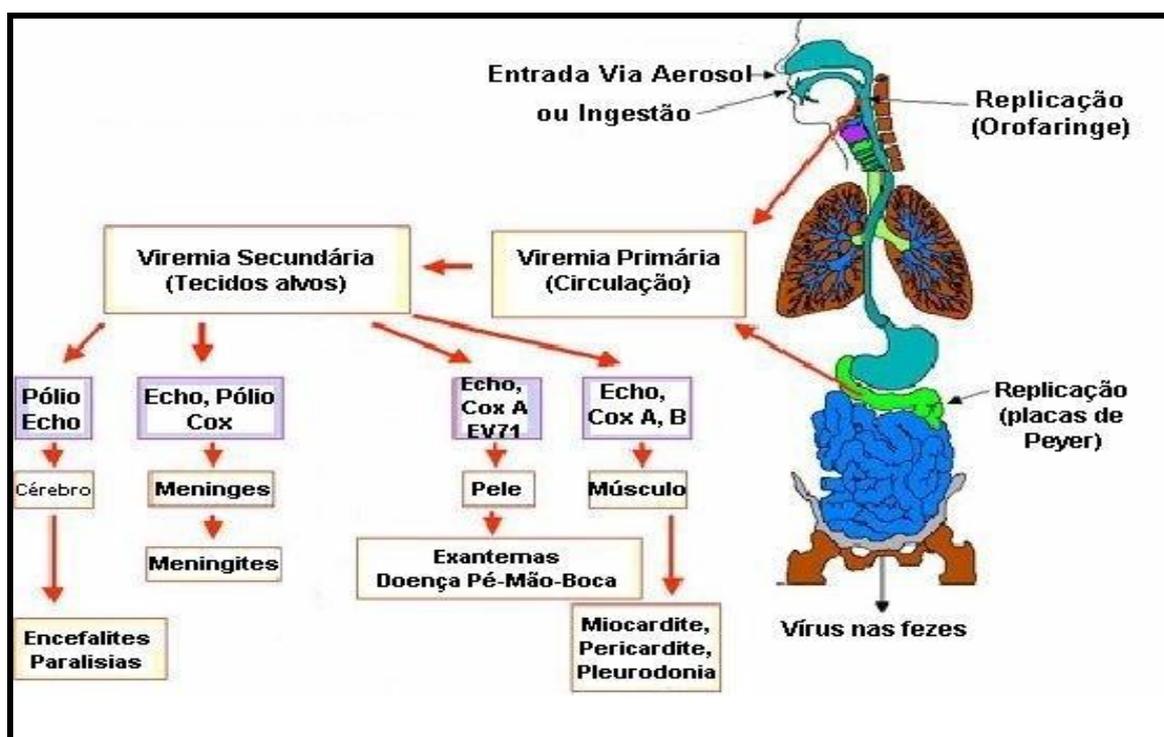
O período de incubação é, geralmente, de sete a 14 dias. Entretanto, pode variar de três a 35 dias (RACANIELLO, 2001). A mucosa intestinal e o trato respiratório superior são os sítios da infecção primária, com a disseminação secundária para o sistema nervoso central (SNC) e outros tecidos (OBERSTE; PALLANSCH, 2003).

Após sua entrada no hospedeiro, o vírus sofre replicação primária nas mucosas da orofaringe, amídalas e do intestino (placas de Peyer). O vírus pode ser detectado nesses locais dentro de três dias. A partir desses sítios primários, o vírus

replica-se nos linfonodos cervicais e mesentéricos, causando uma viremia transitória. A maioria das infecções naturais em humanos termina nesta etapa, com sintomas característicos de doença abortiva. A replicação nestes sítios secundários leva a uma viremia secundária, onde o vírus pode ser detectado no sangue (MOORE; MORENS, 1984). A partir deste momento, pode haver uma disseminação sistêmica, alcançando os tecidos do endotélio e medula óssea.

Uma vez presente na corrente sanguínea, o poliovírus pode alcançar o SNC, a menos que um nível de anticorpos neutralizantes seja suficientemente alto para bloquear esse caminho (PALLANSCH; ROOS, 2001). A **Figura 4** mostra a patogênese dos poliovírus e de outros enterovírus não-pólio.

Figura 4 - Patogênese dos Enterovírus.



Fonte: MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY ON-LINE. Adaptado por Costa (1999). Acesso em: 23/02/2013.

A principal via de transmissão é a via fecal-oral, por ingestão ou a via respiratória, por contato com aerossóis. Há uma rápida multiplicação na orofaringe, seguida de uma replicação nas placas de Peyer, com excreção de vírus nas fezes. Pode alcançar a corrente sanguínea (viremia primária). Posteriormente, pode alcançar os tecidos alvos (viremia secundária).

Ao alcançar o SNC, o poliovírus replica-se no interior dos neurônios motores, levando a um quadro clínico de paresia, ou seja, paralisia incompleta ou redução

dos movimentos de um ou mais membros inferiores. A intensidade do quadro clínico depende do número de neurônios motores atingidos. Os primeiros sinais de paresia, geralmente, aparecem quando há uma destruição de cerca de 60% dos neurônios correspondentes a um determinado grupamento muscular.

A proliferação do vírus pode ser inibida pela resposta imunológica do indivíduo infectado e alguns neurônios inicialmente agredidos podem ter suas funções recuperadas. Esse fato explicaria a regressão observada em alguns indivíduos do quadro de paresias, na fase pós-febril imediata e até seis meses após a fase aguda (DIAMENT; KOK, 1991).

As manifestações clínicas das infecções por poliovírus são variadas e podem ser descritas em quatro grupos:

- Doença assintomática ou infecção inaparente (>90%-95% dos casos) o indivíduo infectado é assintomático. A infecção restringe-se à faringe e ao intestino. Portanto, os vírus podem ser encontrados nas fezes e/ou na garganta;
- “Doença abortiva” ou “doença menor” (4%-8% dos casos) - pode incluir febre, náuseas, vômitos, infecção respiratória semelhante à gripe, porém sem complicações sérias;
- Meningite asséptica ou poliomielite não paralítica (1%-2% dos casos) - além dos sintomas iniciais da doença menor, ocorre invasão do vírus do SNC, ocasionando inflamação das meninges do cérebro, com dores de cabeça fortes, sinais de rigidez de nuca e espasmos musculares, porém sem danos significativos nos neurônios;
- Poliomielite paralítica (0,1%-2% dos casos) - representa a forma mais grave da doença e, geralmente, surge três a quatro dias após desaparecerem os sintomas semelhantes à forma abortiva. Ocorre devido a danos nos neurônios motores da medula espinhal e do córtex motor do cérebro. Caracteriza-se por um quadro de paresia, quando são afetados apenas um grupamento de músculos ou de paralisia flácida, quando os músculos afetados perdem sua função e os membros tornam-se frouxos e sem vida. Esse quadro de paralisia flácida aguda é característico da poliomielite espinhal. Uma forma ainda mais grave é a poliomielite bulbar, que se caracteriza pela perda dos movimentos respiratórios, em função

da destruição dos neurônios do bulbo do tronco encefálico. Existe ainda a poliomielite bulbo-espinal quando ambas as regiões são comprometidas.

1.2 ENTEROVÍRUS NÃO-PÓLIO

Os enterovírus frequentemente infectam o SNC e induzem a doenças neurológicas, como é o caso da poliomielite. Entretanto, também têm sido associados a outras doenças humanas, incluindo miocardite (KLINGEL et al, 1992); pancreatite (RAMSINGH, 2008); miopatia inflamatória crônica (TAM; MESSNER, 1999); infecções respiratórias (MOORE; MORENS, 1984; CHONMAITREE; MANN, 1995); herpangina (MOORE; MORENS, 1984; MELNICK, 1996); pleurodinia (DALLDORF; MELNICK, 1965; PALLANSCH; ROOS, 2001); doenças exantemáticas (MOORE; MORENS, 1984; MELNICK, 1996; DA SILVA et al, 2005); doença febril aguda inespecífica (PALLANSCH; ROOS, 2001; DA SILVA et al, 2005); conjuntivites (YAMAZAKI; OISHI; MINEKAWA, 1995; DA SILVA et al, 2005) e, como dito anteriormente, paralisias não associadas a poliovírus (MOORE; MORENS, 1984).

Em virtude da iniciativa de erradicação global da poliomielite com intensas campanhas de imunização, houve uma redução acentuada nos casos de PFA causados por poliovírus. Contudo, casos de PFA não associados a poliovírus e outros agravos que acometem o SNC foram observados. Abriu-se, portanto, um novo campo para o estudo de outros enterovírus considerados não-pólio (EVNP), associados a surtos e epidemias em diversas localidades do mundo (SILVA; WINKLER; PALLANSCH, 1996). EVNP têm como alvo o SNC e são responsáveis por diversas manifestações clínicas, incluindo encefalites e meningites (MICHOS et al, 2007).

Sendo assim, é importante identificar o sorotipo de EVNP circulante para o entendimento da epidemiologia da infecção do vírus na população (APOSTOL et al, 2012a). Torna-se possível, dessa forma, investigar a diversidade de vírus co-circulantes; determinar a correlação entre dados celulares e bioquímicos durante uma infecção; além de ser possível relacionar o tipo de sintomas clínicos com o sorotipo de enterovírus, incluindo investigação viral de vias de transmissão em épocas de surtos. Além disso, a caracterização dos enterovírus é de extrema

importância para distinguir as infecções provocadas por poliovírus daquelas provocadas por EVNP no contexto da erradicação global da poliomielite (ITURRIZA-GÓMARA; MEGSON; GRAY, 2006).

O **Quadro 2** mostra algumas manifestações clínicas mais comuns causadas por EVNP.

Quadro 2 - Manifestações clínicas mais comuns causadas por enterovírus não-pólio.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	PRINCIPAIS SOROTIPOS IDENTIFICADOS
Conjuntivite	EV-70; CV-A24; -A9; -A10; -A16; CV-B5; E-1; E-4; E-6; E-7; E -9; E-16 e E-20. ^{d,g}
Doenças exantemáticas	EV-A71; CV-A16; -A6; -A7; -A10; -A14; E-9; E-16. ^{b,e,h,k}
Doença febril aguda inespecífica	CV; E; EV. ^{f,g}
Encefalite	CV-B5; E- 4; E-6; E-9; E-11; E-30; EV 71; CV do grupo A. ^{c,e}
Herpangina	CV-A2; -A4; -A5; -A6; -A10; CV do grupo B; E. ^{b,e,j,k}
Infecções respiratórias	CV-A2; -A4; A5; -A6; -A10; CV-B1; -B2; -B3; -B5; E-9; E-18; E-20 e E-30. ^{b,e}
Meningites	CV-B5; E- 4; E-6; E-9; E-11; E-30; EV 71; CV do grupo A. ^{c,e}
Miopericardite	CV do grupo B. ^b
Paralisias flácidas agudas	CV-A7; EV-A71, EV-A76, EV-A89, EV-A90, EV-A91. ^{b,f,g,k}
Pleurodinia	CV-B3; -B5. ^{a,f}
Infecções neonatais	CV do grupo B; E, particularmente, E-11. ^g

CV- Coxsackievírus; E- Echovírus; EV- Enterovírus.

^a DALLDORF; MELNICK, 1965

^b MOORE; MORENS, 1984.

^c ROTBART, 1995.

^d YAMAZAKI, 1995.

^e MELNICK, 1996.

^f PALLANSCH; ROOS, 2001.

^g DA SILVA et al, 2005.

^h YANG et al, 2011.

ⁱ BLOMQUIST et al, 2010.

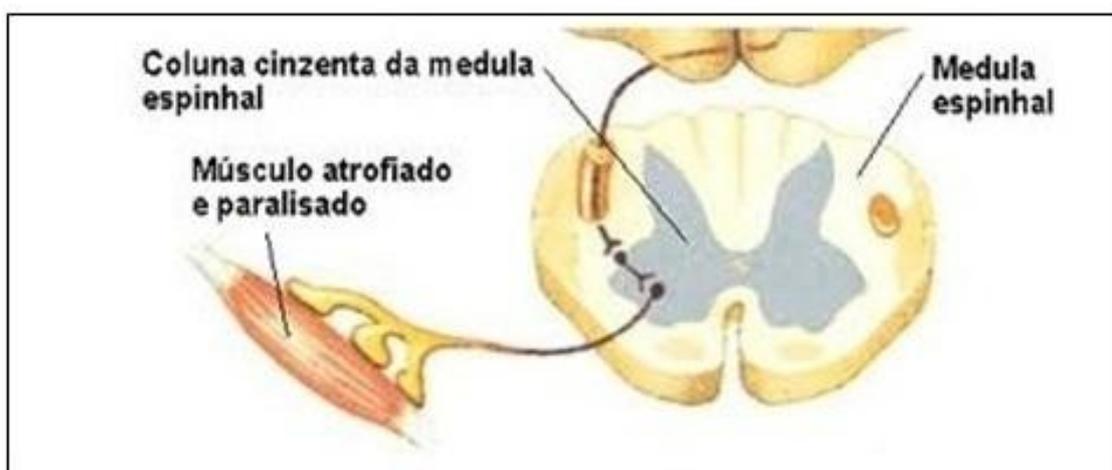
^j HSU et al, 2011.

^k YAMAYOSHI et al, 2012.

1.3 POLIOMIELE

A palavra “poliomielite” vem do grego. “Polio” significa cinza; “mielos”, medula, indicando a medula espinhal e o sufixo “ite”, inflamação. Portanto, é uma doença inflamatória aguda, resultante da destruição dos neurônios motores localizados no corno anterior ou coluna cinzenta da medula espinhal (**Figura 5**).

Figura 5 - Estrutura anatômica ilustrativa de corte transversal da medula espinhal.



Fonte: Adaptado de ANATOMIA E FISILOGIA HUMANAS. Acesso em: 13/02/2013.
Esquema ilustrativo de um corte transversal da medula espinhal, mostrando a atrofia e paralisção de um músculo em função da destruição do neurônio motor, localizado no corno anterior ou coluna cinzenta da medula espinhal.

Acredita-se que a poliomielite seja uma doença que acometa o homem desde a antiguidade. Talvez o relato mais antigo seja de uma figura egípcia de 1350 a.C., retratando um jovem com uma típica paralisia flácida assimétrica e atrofia da perna. As primeiras descrições clínicas da poliomielite foram feitas entre os séculos XVII e XVIII (WORLD AND HEALTH ORGANIZATION).

Somente 1% dos indivíduos infectados por poliovírus é sintomático. Todavia, mesmo indivíduos assintomáticos excretam o vírus por algumas semanas, podendo, portanto, transmitir a infecção a outros indivíduos suscetíveis (WORLD AND HEALTH ORGANIZATION).

O efeito dos poliovírus na medula espinhal leva à manifestação clássica da paralisia. O déficit motor instala-se subitamente e a evolução dessa manifestação,

frequentemente, não ultrapassa três dias. Acomete, em geral, os membros inferiores, de forma assimétrica, tendo como principal característica a flacidez muscular, com sensibilidade conservada e arreflexia no segmento atingido, sinalizando uma paralisia flácida aguda (PFA) (MOORE; MORENS, 1984; MODLIN, 1995).

O risco de infecção está diretamente relacionado a baixas condições sanitárias e de higiene, assim como, ao aumento do número de indivíduos suscetíveis em populações vacinadas inadequadamente (KHODAEI et al, 2008). Em regiões onde as condições sanitárias são precárias, a transmissão de poliovírus se dá, principalmente, via fecal-oral, enquanto que, a via oral-oral representa a forma de transmissão em países desenvolvidos ou em regiões com condições sanitárias adequadas (KEW et al, 2005).

A primeira vacina contra a poliomielite foi desenvolvida por Jonas Salk, no início da década de 1950. A vacina era composta de poliovírus inativados artificialmente e foi considerada eficaz na redução drástica dos casos clínicos de poliomielite em países em que foi empregada (SCHATZMAYR et al, 2002).

A vacina Salk, também conhecida como vacina inativada contra a poliomielite (VIP), começou a ser utilizada no Brasil a partir de 1955. Entretanto, em função do seu alto custo e dificuldades operacionais na sua aplicação em larga escala, foi usada apenas em amplitudes bem reduzidas (SCHATZMAYR et al, 2002). Por sua vez, em 1962, Albert Sabin e seus colaboradores criaram a vacina VOP, a partir de vírus atenuados (PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 1996).

As vacinas de Salk e Sabin conduziram a um declínio acentuado da doença nos países mais desenvolvidos, logo nos primeiros anos de administração. Este declínio, também foi sentido nos países menos desenvolvidos. Contudo, ocorreu mais lentamente (PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 1996). A partir desse momento, foram desenvolvidas várias campanhas mundiais, pela OMS, desencadeadas em 1988, com o objetivo de erradicar a doença por todo o mundo (MOORE; MORENS, 1984; MODLIN, 1995).

Como mencionado anteriormente, a poliomielite é altamente contagiosa. Em regiões endêmicas, muitas crianças são infectadas ainda no primeiro ano de vida Sabin (SUTTER; KEW; COCHI, 2004 apud KEW et al, 2005).

Em regiões de climas temperados, a transmissão de poliovírus é altamente sazonal, com picos de transmissão no verão e no outono e redução no inverno. Em regiões de climas tropicais, a transmissão de poliovírus ocorre durante todo o ano, embora possam ser observados alguns picos sazonais (MINOR, 2004; KEW et al, 2005).

1.3.1 Poliomielite no Brasil

O Brasil recebeu da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), em 29 de setembro de 1994, o certificado de interrupção da transmissão dos vírus selvagens da poliomielite (SCHATZMAYR et al, 2002).

A primeira descrição de um surto, no Brasil, foi no ano de 1911, no Rio de Janeiro. Em 1917, houve descrição de outro surto em Vila Americana, estado de São Paulo (CAMPOS; NASCIMENTO; MARANHÃO, 2003). Entretanto, já no final do século XIX, havia referências a casos esporádicos da doença (SCHATZMAYR et al, 2002; CAMPOS; NASCIMENTO; MARANHÃO, 2003).

Em 1953, ocorreu no Rio de Janeiro, a maior epidemia até então registrada no país (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1988 apud CAMPOS; NASCIMENTO; MARANHÃO, 2003).

Em 1961, o Ministério da Saúde adotou oficialmente a VOP dando início a vacinações sistemáticas contra a poliomielite. Inicialmente, num plano-piloto de vacinação, na cidade de Petrópolis no Rio de Janeiro, foi utilizada apenas a vacina monovalente, contendo o sorotipo 1, seguida de duas doses trivalentes (sorotipos 1, 2 e 3) (SCHATZMAYR et al, 2002; CAMPOS; NASCIMENTO; MARANHÃO, 2003). Posteriormente, este esquema de vacinação não foi adotado. Preferiu-se, contudo, utilizar apenas vacinas trivalentes. O governo federal adquiriu três milhões de doses da VOP para ampliar a campanha de vacinação (CAMPOS; NASCIMENTO; MARANHÃO, 2003).

A campanha foi estendida a todo o país, com programas de imunização incluindo várias capitais brasileiras (CAMPOS; NASCIMENTO; MARANHÃO, 2003). No entanto, os programas não tiveram a abrangência e a continuidade necessárias para o controle da doença. O resultado foi a permanência da

poliomielite como um importante problema de saúde pública no país (MEILMAN, 1988 apud SCHATZMAYR et al, 2002).

Em 1960, outra tecnologia de fundamental importância para o controle da poliomielite foi implantada no Brasil: a introdução da técnica de diagnóstico laboratorial do poliovírus (SCHATZMAYR et al, 2002; CAMPOS; NASCIMENTO; MARANHÃO, 2003).

Em 1971, o Ministério da Saúde elaborou o Plano Nacional de Controle da Poliomielite. Este plano estabelecia a vacinação em massa da população infantil, aplicando-se três doses da vacina oral atenuada contra a poliomielite trivalente (tVOP), com intervalos de seis a oito meses entre cada uma delas (SCHATZMAYR et al, 2002). Em 1973, foi implementado o Programa Nacional de Imunização (PNI). O PNI incluía a proposta de reduzir a morbidade e mortalidade por doenças evitáveis por imunização. Foi introduzida a multivacinação, principalmente com inclusão da vacina de sarampo como estratégia de campanhas. Entretanto, a estratégia da campanha foi abandonada, em 1974, priorizando-se a vacinação de rotina pela rede básica de saúde (CAMPOS; NASCIMENTO; MARANHÃO, 2003).

Em 1975, foi implantando o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica, incluindo a da poliomielite. Estabeleceram-se normas técnicas referentes à notificação, investigação dos casos, confirmação laboratorial e avaliação de sequelas dos casos e investigação epidemiológica em âmbito nacional. Estabeleceu-se um novo plano de ação para o período de 1980 a 1984 (RISI, 1984). Criaram-se dois dias de vacinação em massa, empregando-se a VOP, a fim de se alcançar alta cobertura vacinal em todas as regiões brasileiras em um único dia e, dessa forma, interromper a circulação do vírus selvagem, pela disseminação do vírus vacinal em todo país.

De 1980 a 1983, as coberturas vacinais atingiram cerca de 100% das crianças até cinco anos, levando a uma diminuição do número de casos, de 2.564 em 1979 para 45 em 1983 (BRASIL, 2003). Entretanto, talvez por acreditar-se que a poliomielite já havia sido controlada definitivamente, houve uma queda no percentual de cobertura vacinal entre 1984 e 1986. Conseqüentemente, o número de casos voltou a elevar-se para 142, em 1984; 329 casos em 1985 e 612, em 1986 (SCHATZMAYR et al, 2002).

Nos anos seguintes, ainda foram observados casos no Nordeste, sobretudo em áreas urbanas com baixo nível de saneamento básico. Em 1989, foram notificados, finalmente, os três últimos casos causados por poliovírus selvagens, nos estados do Rio Grande do Norte e da Paraíba. O último caso de poliomielite no Brasil causado pelo vírus selvagem ocorreu no município de Sousa, na Paraíba (1989). Nas Américas, o último caso ocorreu no Peru, em 1991 (SCHATZMAYR et al, 2002).

A estratégia dos dias nacionais de vacinação alcançou reconhecimento público, sendo até hoje implementada sistematicamente no Brasil. Inclusive, adquiriu dimensão internacional, ao ser recomendada pela OPAS como modelo na proposta de interrupção da transmissão do poliovírus selvagem na região das Américas (CAMPOS; NASCIMENTO; MARANHÃO, 2003).

1.4 VACINAS CONTRA A POLIOMIELITE

Embora estudos mostrem que outras vacinas têm sido desenhadas contra alguns EVNP, o poliovírus ainda representa o único enterovírus contra o qual existe vacina disponível (RHOADES et al, 2011).

Duas diferentes vacinas foram desenvolvidas contra a poliomielite, a VIP de Jonas Salk e Younger (PLOTKIN; VIDOR, 2004 apud KEW et al, 2005) e a VOP de Albert Sabin (SUTTER; KEW; COCHI, 2004 apud KEW et al, 2005). Ambas têm um papel importante no controle da doença no mundo, sendo consideradas seguras e eficazes na indução de resposta humoral, cada qual com suas vantagens e desvantagens (PAUL, 1971; ROBBINS, 2004 apud KEW et al, 2005).

1.4.1 Vacina inativada contra a poliomielite (VIP)

A VIP foi a primeira vacina contra a poliomielite a ser licenciada em 1955. Sua aplicação se dá via intramuscular, podendo também ser aplicada via subcutânea. Requer, portanto, o uso de agulhas e seringas estéreis, além de profissionais treinados para sua aplicação.

Estudos mostram que a VIP tem sido eficaz tanto em programas de vacinação em países industrializados quanto naqueles em desenvolvimento (ROBERTSON, et al, 1988; JOHN, 1992; ALEXANDER, 2004 apud OKAYASU, 2011). Atualmente, sessenta países industrializados utilizam, em seus programas de vacinação, somente a VIP ou uma sequência combinada de VOP/VIP (OKAYASU, 2011).

Em relação à indução de resposta imune, tem se mostrado altamente eficiente na indução de níveis adequados de anticorpos séricos, conferindo imunidade humoral (FADEN, 1990; DAYAN, 2007; OKAYASU, 2011). Entretanto, é menos eficiente que a VOP na estimulação de resposta imune de mucosa (OKAYASU, 2011).

Por ser menos eficiente na indução de resposta imune da mucosa intestinal, o uso de VIP permite a excreção de poliovírus selvagem por pessoas vacinadas. Embora possuam anticorpos protetores, essas pessoas, quando em contato com o vírus selvagem, mesmo sem desenvolverem a doença, podem servir de fonte de infecção para outras pessoas suscetíveis, uma vez que não há barreiras para a replicação destes vírus em seu trato intestinal (MOORE; MORENS, 1984; MODLIN, 1995; MELNICK, 1996).

1.4.2 Vacina oral atenuada contra poliomielite (VOP)

A VOP consiste de cepas de poliovírus atenuados (cepas Sabin) dos três sorotipos de poliovírus. Foi desenvolvida por Albert Sabin, em 1961 e licenciada para uso em 1961 e 1962 (MINOR, 2004; KEW et al, 2005; OKAYASU, 2011).

VOP monovalente foi licenciada para uso em 1961 e 1962 nos Estados Unidos. Em 1964, a tVOP e foi introduzida, permanecendo como a única formulação disponível nos programas de erradicação da poliomielite da OMS até 2005. Posteriormente, foi reintroduzida a formulação monovalente para ser usada em casos de surtos. Em 2009, foi liberada a formulação bivalente (WHO, 2009).

A tVOP, responsável pela drástica redução do número de casos de poliomielite, é formulada a partir de uma concentração mínima estabelecida para cada um dos componentes da vacina. Para os sorotipos 1, 2 e 3 são utilizadas concentrações de vírus de $10^{5,5}$, $10^{4,5}$ e $10^{5,2}$ de dose infectante em 50% de cultura

de células (TCID₅₀), respectivamente. As diferentes concentrações de cada sorotipo na mesma vacina trivalente representam um balanço na formulação, levando-se em consideração a replicação mais eficiente do poliovírus atenuado tipo 2 no trato gastrointestinal. Caso o vírus tipo 2 seja dado na mesma concentração dos tipos 1 e 3, haverá interferência na replicação desses dois últimos sorotipos (MODLIN, 1995; WHO, 1998).

A VOP induz a uma boa resposta imune humoral e de mucosa e provou ser uma vacina muito eficaz na interrupção da transmissão de poliovírus selvagens (KEW et al, 2005).

Neste processo de erradicação, a VOP teve um papel fundamental, tanto pela facilidade de sua administração, favorecendo altas taxas de cobertura vacinal, bem como pela maior disseminação do vírus vacinal pela via fecal-oral (CARVALHO; WECKX, 2006). Todavia, por ser geneticamente instável, a VOP tem sido associada a alguns eventos adversos, como: pode ocasionar casos de poliomielite associada ao vírus vacinal ou poliomielite pós-vacinal (VAAP) e pode originar poliovírus derivados da vacina (PVDV) (KEW et al, 2005).

1.4.2.1 Poliomielite associada ao vírus vacinal (VAAP)

Um evento adverso associado ao uso da VOP é a poliomielite associada ao vírus vacinal ou poliomielite pós-vacinal (VAAP), a qual é clinicamente semelhante à poliomielite causada por poliovírus selvagens (KEW et al, 2005).

Os vírus atenuados presentes na VOP são passíveis de sofrerem mutações. Algumas cepas excretadas por indivíduos vacinados, particularmente as dos sorotipos 2 e 3, podem sofrer mutações não-sinônimas e originar subpopulações com reversão ao fenótipo neurovirulento (MELNICK, 1996; RACANIELLO, 2001). Cada evento de reversão parece ocorrer no trato gastrointestinal de muitos indivíduos imunizados com vacinas constituídas de cepas Sabin (MARTINEZ et al, 2004). Em raros casos, indivíduos vacinados e seus contactantes mais próximos podem desenvolver a VAAP (MINOR, 2004; KEW et al, 2005).

1.4.2.2 Poliovírus derivados da vacina (PVDV)

Como mencionado anteriormente, durante replicações no intestino do indivíduo vacinado, as cepas atenuadas (Sabin) podem sofrer mutações resultando na reversão ao fenótipo neurovirulento, originando poliovírus derivados da vacina (PVDV), capazes de causar paralisia e, ao mesmo tempo, manterem-se circulantes na população (KEW et al, 2005; DOWDLE; KEW, 2006; DEDEPSIDIS et al, 2007; PLIAKA et al, 2011; CHATTERJEE et al, 2013).

Todos os poliovírus isolados são submetidos a ensaios para diferenciação intratípica (ITD). Os resultados nos ensaios ITD considerados “não *Sabin like*” são classificados como poliovírus selvagens; os resultados “*Sabin like*” são classificados como vírus vacinais. Posteriormente, sugere-se o sequenciamento completo da região que codifica a VP1 das amostras consideradas “*Sabin like*” ou “não *Sabin like*” e daquelas com resultados discordantes. Em seguida, as sequências são analisadas quanto ao número de mutações encontradas de acordo com critérios definidos pela OMS (WHO, 2004; BLOMQUIST et al, 2012).

A presença de 1% ou mais de divergência na sequência de nucleotídeos da região VP1 do genoma viral classifica os tipos 1 e 3 como PVDV. Enquanto que, diferenças de seis ou mais nucleotídeos (0,6%) classifica o tipo 2 como um PVDV. Se apresentar menos de 1% de divergência, o vírus é considerado “*Sabin like*” (BLOMQUIST et al, 2012). Essa demarcação de 1% de diferença na sequência nucleotídica de VP1 indica que a replicação do vírus vacinal tenha ocorrido há aproximadamente um ano (KEW et al, 2005).

Os PVDVs estão classificados em três categorias distintas: (1) poliovírus derivados da vacina circulantes (cPVDV) - associados à transmissão sustentada de pessoa a pessoa com capacidade de extensa circulação nas comunidades e causadores de surtos de poliomielite semelhantes àqueles causados pelos poliovírus selvagens; (2) poliovírus derivados da vacina relacionados à imunodeficiência (iPVDVs) - isolados de pacientes com imunodeficiência primária, os quais apresentam uma excreção prolongada do vírus, após a exposição à VOP e, (3) poliovírus derivados da vacina ambíguos (aPVDVs) - isolados de pacientes imunocompetentes, não associados a surtos ou isolados de amostras ambientais de origem desconhecida (DOWDLE; KEW, 2006).

Se uma população é sub-imunizada, o vírus vacinal pode continuar circulando por um longo período de tempo. Os cPVDV ocorrem quando as atividades de imunização suplementares ou de rotina são precariamente conduzidas e a população torna-se suscetível aos PVDVs ou ao poliovírus selvagem. Dessa forma, o problema não está no uso da VOP e sim na baixa cobertura vacinal. Se uma população for imunizada de forma eficiente, estará protegida não somente contra o poliovírus selvagem como os PVDVs (GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2011d).

A existência de cPVDV foi descoberta em 2000, durante um surto da Ilha de Hispaniola. Vinte e um casos de paralisia foram investigados causados pelo sorotipo 1. Em seguida, foram relatados surtos semelhantes nas Filipinas, 2001, Egito, Madagascar, China, Camboja, Mianmar, Indonésia e Nigéria (KEW et al, 2005; MMWR, 2009; GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2013c). Desde então, um ou mais surtos têm sido relatados por ano, casos isolados de paralisia atribuídos a cPVDV têm ocorrido em indivíduos saudáveis e imunodeficientes, além de PVDVs não associados a doença terem sido detectados no ambiente (MODLIN, 2010). A **Figura 6** mostra a distribuição geográfica da circulação de cPVDV de 2000 a 2013.

Figura 6 - Distribuição geográfica da circulação de cPVDV entre 2000 e 2013.

Country	cVDPV type 1*													Most recent transmission chain			
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	First case	Most recent case	Duration in weeks
Mozambique												2			10-Feb-11	02-Jun-11	16
Myanmar							1	4							30-Apr-07	06-Dec-07	31
Indonesia						46									09-Jul-05	26-Oct-05	15
China				2											13-Jun-04	11-Nov-04	21
Philippines		3													15-Mar-01	26-Jul-01	19
DOR/Haiti	12	9													12-Jul-00	12-Jul-01	52
Total type 1	12	12	0	0	2	46	1	4	0	0	0	2	0	0			
Country	cVDPV type 2*													Most recent transmission chain			
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	First case	Most recent case	Duration in weeks
Pakistan												16	3		30-Aug-12	10-Apr-13	31
Afghanistan										5	1	9	3		10-Jun-10	13-Mar-13	143
Chad										1		12	1		15-Aug-12	04-Feb-13	24
Somalia								1	6	1	9	1	1		18-Aug-09	09-Jan-13	177
Nigeria					3	22	71	66	154	27	34	8			02-Jul-05	24-Nov-12	386
Kenya												3			18-Apr-12	25-Jun-12	9
DR Congo									13	5	18	11	17		04-Nov-11	04-Apr-12	21
Niger						2				2	1	1			11-Nov-11	11-Nov-11	<1
Yemen												9			09-Apr-11	05-Oct-11	25
India									15	2					19-Oct-09	18-Jan-10	13
Ethiopia								3	1						04-Oct-08	16-Feb-09	19
Madagascar		1	4			3									26-Jun-05	13-Jul-05	2
Total type 2	0	1	4	0	0	6	24	71	83	183	55	65	66	8			
Country	cVDPV type 3*													Most recent transmission chain			
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	First case	Most recent case	Duration in weeks
Yemen													2		27-Apr-12	24-Aug-12	17
Ethiopia										1	6				27-Apr-09	17-May-10	55
Cambodia						1	1								26-Nov-05	15-Jan-06	7
Total type 3	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	6	0	2	0			

Fonte: GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2013c. Disponível em: < <http://www.polioeradication.org/Dataandmonitoring/Poliothisweek/Circulatingvaccinederivedpoliovirus.aspx>>. Acesso em: 28/05/2013.

cVDPV - cPVDV. Country - país. Type - tipo. Most recent transmission chain - cadeia de transmissão mais recente. First case - primeiro caso. Most recent case - caso mais recente. Duration in weeks - duração em semanas. Distribuição geográfica de cPVDV. cPVDV está associado com dois ou mais casos de PFA. Casos em Níger/2006; em Níger/2009; em Níger 2010/ no Chade/2010 estão ligados ao surto na Nigéria. Casos no Quênia/2012 estão ligados ao surto na Somália. PVDV tipo 2 - casos com diferença nucleotídica em seis ou mais nucleotídeos na região VP1 comparado à cepa Sabin 2. PVDV tipos 1 e 3 - casos com diferença nucleotídica em dez ou mais nucleotídeos na região VP1 comparado às cepas Sabin 1 e 3. ** Caso de cPVDV devido à importação.

1.5 PROGRAMA DE ERRADICAÇÃO GLOBAL DA POLIOMIELITE

Nos estudos em saúde pública, existem definições diferentes para os termos erradicação e eliminação de uma doença. Erradicação significa a interrupção permanente da circulação de seu agente etiológico ou de seu vetor em escala mundial sendo, portanto, impossível a sua reintrodução e totalmente desnecessária a manutenção de quaisquer medidas de prevenção (DOWDLE, 1998; WHO, 1998; WALDMAN; SILVA; MONTEIRO, 1999). Por outro lado, a eliminação de uma

doença é definida como a interrupção de sua transmissão em uma limitada área geográfica, com riscos de reintrodução, por falha na utilização dos instrumentos de controle ou, simplesmente, pela modificação do seu comportamento (WALDMAN; SILVA; MONTEIRO, 1999).

A primeira e única doença infectocontagiosa erradicada com sucesso foi a varíola. Em 1980, a Assembleia Mundial da Saúde da OMS anunciou a sua erradicação em escala mundial (FENNER, 1988 apud NOMOTO; ARITA, 2002). Desde então, abriu-se caminho para novos desafios com o intuito de erradicar outras doenças imunopreveníveis. A fim de alcançar esse objetivo, a OMS estabeleceu o Programa Ampliado de Imunizações (PAI), que tinha como alvo seis doenças infecciosas, incluindo a poliomielite e o sarampo (KEW et al, 2005).

Em 1985, a OPAS deu início ao Programa Regional de Imunizações a fim de eliminar a transmissão de poliovírus selvagem na região das Américas até o ano de 1990. Com o uso da VOP em dias nacionais de imunização e com intensas atividades de vigilância, foi possível alcançar uma redução da incidência da poliomielite (PAHO, 1985; MMWR, 1992; KEW et al, 2005).

Com base no sucesso deste programa na região das Américas e nos altos níveis de imunização alcançados pelo PAI, a 41ª Assembleia Mundial da Saúde da OMS iniciou, em 1988, um programa denominado Iniciativa de Erradicação Global da Polio (*Global Polio Eradication Initiative*, GPEI), com o propósito de erradicar globalmente a poliomielite até o ano 2000 (WHO, 1988).

Para alcançar esse objetivo, foram estabelecidas quatro estratégias a serem cumpridas por todos os países que adotaram o programa, como: manutenção de rotina de imunização com alta cobertura; dias nacionais de imunização; sistema de vigilância das PFA e atividades rápidas de imunização em resposta a epidemias (WHO 1988; MMWR, 1993; KEW et al, 2005).

A VOP foi a vacina de escolha para esse propósito por apresentar baixo custo; ser de fácil administração; possibilitar a imunização secundária dos contactantes do receptor da vacina; além de induzir a uma melhor resposta imune intestinal frente à VIP (WHO 1988, KEW et al, 2005).

Embora a erradicação não tenha sido ainda alcançada, o programa já atingiu uma redução global de mais de 99% na incidência de transmissão de poliovírus selvagens. De 1988 a 2000, houve uma redução do número de casos de 350.000

em 125 países para 3.500 em 20 países considerados endêmicos para a doença (MMWR, 2003).

Atualmente, apenas três países são considerados endêmicos (Nigéria, Paquistão e Afeganistão) (GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2013a). Todavia, casos de re-emergência de poliovírus selvagens em países livres de pólio, importados de países endêmicos, têm sido relatados (GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2013a). A incidência global da poliomielite em 2012 foi de 223 casos, sendo 97% dos casos confirmados em países endêmicos (Afeganistão= 37 casos; Nigéria= 122 casos e Paquistão= 58 casos). Os 3% restantes foram confirmados em países considerados não endêmicos (casos de importação de poliovírus selvagens): Níger (1 caso) e República Democrática do Chade (5 casos). Em 2013, até o mês de maio, 35 casos relacionados de poliovírus selvagens foram confirmados em países endêmicos (Afeganistão= 2 casos; Nigéria= 24 casos e Paquistão= 9 casos). Seis casos de importação de poliovírus selvagens foram relatados (Somália= 4 casos; Quênia= 2 casos). Vale ressaltar que também são relatados casos de poliomielite associados a poliovírus derivado da vacina circulante. Em 2012, foram relatados 68 casos de cPVDV (Afeganistão= 9 casos; Paquistão= 16 casos; Nigéria= 8 casos; Iêmen= 2 casos; República do Chade= 12 casos; República do Congo= 17 casos; República do Quênia= 3 casos; Somália= 1 caso). Até maio de 2013, 9 casos de cPVDV foram relatados (Afeganistão= 3 casos; Paquistão= 4 casos; Chade= 1 caso e Somália= 1 caso) (GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2013c).

Até 2011, a Índia integrava o grupo de países endêmicos. A interrupção da circulação de poliovírus selvagens autóctones neste país representava um grande desafio para o GPEI. Contudo, em fevereiro de 2012, foi declarada livre de pólio, reacendendo a ideia de que erradicação é possível e fortalecendo os esforços na tentativa de alcançá-la mundialmente nos próximos anos (MMWR, 2012).

Enquanto os poliovírus selvagens não forem erradicados completamente, continuarão a se espalhar e a reinfetar regiões anteriormente livres. Tem sido reportado que a perda da exposição ao poliovírus selvagens endêmicos nestes países, levou a um aumento do número de jovens adultos suscetíveis, ou seja, pessoas sem imunidade natural contra os poliovírus. Como consequência, houve um aumento no número de surtos afetando adultos representando os maiores

casos de fatalidade. Foi o caso da República do Congo (2010) e da China (2011) que tiveram surtos de poliovírus selvagens importados, sendo que a metade das vítimas era adulta (GPEI, 2011a; 2011b).

Dados mostram que em relação aos 223 casos relatados em 2012, houve uma redução de 66% quando comparados aos de 2011. Até o final de 2012, Angola e República do Congo, que anteriormente havia reestabelecido a transmissão de poliovírus selvagens, alcançaram a sua interrupção com sucesso. A República do Chade também está próxima de alcançar o mesmo. Em 2012, somente cinco países reportaram casos comparados aos 16 países que reportaram em 2011 (GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2013b).

Em relação aos países endêmicos, houve uma redução do número de casos relatados no Paquistão e no Afeganistão para 65% e 42% comparado ao ano de 2011, respectivamente. Na Nigéria, apesar do aumento da cobertura vacinal, o número de casos, em 2012, duplicou em relação ao ano de 2011 (GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2013b).

No final de 2012, foi traçada uma nova meta de erradicação e um plano estratégico final para os próximos anos de 2013 a 2018 (*Polio Eradication and Endgame Strategic Plan 2013-2018*) (GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2013b).

A meta principal deste plano é finalizar a erradicação da poliomielite, de modo a eliminar qualquer possibilidade de uma criança voltar a ter poliomielite, assim como, estabelecer as diretrizes de contenção de todos os poliovírus selvagens, cepas vacinais Sabin e PVDV (GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2013b).

A erradicação da poliomielite depende da vigilância efetiva global, que tem como principal função nortear as estratégias de imunização, verificação dos seus resultados e certificação do sucesso das metas alcançadas. A vigilância dos casos de PFA ainda é a melhor estratégia para se detectar poliovírus selvagens e/ou PVDV (GPEI, 2011c; GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2013b).

Desta forma, dentro do programa de erradicação da poliomielite, o principal objetivo da vigilância epidemiológica no Brasil é manter o país livre da circulação do poliovírus selvagem. Para isso, todo caso de PFA em menores de quinze anos de idade ou suspeita de poliomielite em indivíduo de qualquer idade procedente de

países com circulação de poliovírus selvagem, nos últimos 30 dias, deve ser obrigatoriamente notificado, investigado imediatamente, registrado no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Posteriormente, deve ser coletada uma amostra de fezes até o 14^o dia do início da deficiência motora para isolamento viral (amostra oportuna) e esclarecimento diagnóstico (BRASIL, 2007; BRASIL, 2012a).

É inegável o sucesso e a contribuição da utilização da VOP na erradicação da poliomielite. A interrupção do seu uso deverá ser cuidadosamente programada e planejada. As principais estratégias a serem consideradas após a interrupção da VOP, mundialmente, são uma vigilância ativa e a não interrupção da imunização com a vacina poliomielite inativada - VIP. Como países desenvolvidos e em desenvolvimento declararam a intenção de continuar com a imunização de suas populações, mesmo após a erradicação do poliovírus selvagem, a VIP deverá ser utilizada nesses países para prevenir a reintrodução do vírus selvagem e o ressurgimento da poliomielite (BRASIL, 2012a).

Reitera-se a necessidade do alcance de coberturas vacinais maiores ou iguais a 95% em todos os municípios brasileiros, para manutenção de área livre de circulação de poliovírus selvagem, para evitar o risco de reintrodução da poliomielite no Brasil e a ocorrência de surtos de PVDVs (BRASIL, 2012a).

1.5.1 Calendário de Vacinação no Brasil

No Brasil, desde 1980, a tVOP tem sido aplicada nos Dias Nacionais de Vacinação em massa, duas vezes por ano, em um só dia, em todos os menores de cinco anos de idade, independente de história vacinal anterior (BRASIL, 2012a).

Uma dose de tVOP produz imunidade para os três sorotipos em aproximadamente 50% dos receptores, enquanto três doses produzem imunidade em mais de 95% dos receptores (BRASIL, 2012a).

Visando a introdução da VIP, o Brasil, desde agosto de 2012, incluiu a VIP em seu esquema de vacinação em crianças que iniciaram o calendário básico de vacinação. O esquema de vacinação sequencial (VIP/VOP) é composto por duas doses de VIP e duas doses de VOP (BRASIL, 2012a).

As doses da VIP visam minimizar o risco, embora raro, de VAAP, e as da VOP, manter a imunidade populacional (de rebanho) contra o risco potencial de introdução de poliovírus selvagem através de viajantes oriundos de localidades que ainda apresentam casos autóctones da poliomielite, por exemplo (BRASIL, 2012a).

A **Figura 7** mostra o esquema de vacinação sequencial VIP/VOP introduzido no Brasil, a partir de agosto de 2012, de acordo com idade e vacina recomendada.

Figura 7 - Esquema de vacinação sequencial VIP/VOP de acordo com idade e vacina recomendada.

Idade	Vacina
2 meses (idade mínima – 6 semanas)	Vacina inativada poliomielite – VIP
4 meses (intervalo mínimo – 30 dias) *	VIP
6 meses	Vacina oral poliomielite (atenuada) – VOP
15 meses	VOP

Fonte: BRASIL, 2012a.

Esquema de vacinação sequencial VIP/VOP introduzido no Brasil, a partir de agosto de 2012, de acordo com idade e vacina recomendada. VIP - vacina inativada contra a poliomielite. VOP – vacina oral atenuada contra a poliomielite.

* Nos primeiros 6 meses de idade, o intervalo mínimo de 30 dias só é recomendado se o indivíduo estiver sob risco iminente de exposição à circulação viral (exemplos: viajantes a regiões endêmicas ou em surtos).

Ficou estabelecido, desde 2012, que o Ministério da Saúde, em conjunto com as Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde, irá manter uma etapa da campanha de vacinação anual contra a poliomielite no mês de junho, em todo o território nacional. Em sequência, será realizada no mês de agosto uma campanha de multivacinação, que além de dar continuidade no plano global de erradicação da poliomielite, contribuirá para o controle de outras doenças imunopreveníveis (BRASIL, 2012b).

A multivacinação é uma estratégia onde, em um único momento, são oferecidas à população alvo várias vacinas ao mesmo tempo, a fim de melhorar a cobertura vacinal da população e otimizar a logística dos serviços de saúde (BRASIL, 2012a; 2012b).

A campanha de multivacinação envolverá a aplicação da vacina pentavalente (difteria, tétano, *pertusis*, hepatite B recombinante e *Haemophilus influenzae* tipo b - DTP/HB/Hib) e a manutenção do esquema sequencial VIP/VOP em crianças que iniciarem seus esquemas de vacinação e naquelas que já receberam estas vacinas (BRASIL, 2012b).

1.6 DIREITO E AÇÕES DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE

Segundo a Lei Orgânica nº 8.080/90 (SUS), a saúde é um direito fundamental de todos e cabe ao Estado o dever de garanti-la:

Art. 2º – A saúde é um direito fundamental do ser humano, devendo o Estado prover as condições indispensáveis ao seu pleno exercício.

§ 1 - O dever do Estado de garantir a saúde consiste na formulação e execução de políticas econômicas e sociais que visem à redução de riscos de doenças e de outros agravos e no estabelecimento de condições que assegurem acesso universal e igualitário às ações e aos serviços para a sua promoção, proteção e recuperação (BRASIL, 1990).

As primeiras ações para o controle das doenças e epidemias, como a quarentena e o isolamento são práticas muito antigas. A partir da segunda metade do século XIX, com o desenvolvimento da microbiologia, e de investigações de campo voltadas para a identificação dos elos da cadeia de transmissão das doenças infecciosas, surgiu a idéia de vigilância, no sentido da observação sistemática dos contatos dos doentes (PALMEIRA, 2003).

A Vigilância em Saúde tem por objetivo a observação e a análise permanente da situação de saúde da população, abrangendo as ações de vigilância, promoção, prevenção e controle de doenças e agravos à saúde, devendo constituir espaço de articulação de conhecimentos e técnicas, cuja operacionalização busca integrar as ações de vigilância sanitária, epidemiológica e ambiental em saúde (TEIXEIRA; PAIM; VILASBÔAS, 2000).

A Vigilância Sanitária é a forma mais completa de existência da saúde pública, pois suas ações, de natureza eminentemente preventiva, perpassam todas as práticas médico-sanitárias: promoção, proteção, recuperação e reabilitação da saúde (COSTA; ROZENFELD, 2000).

A Lei nº 8.080/90 (BRASIL, 1990), em seu Artigo 6º, incisos § 1º e 2º, traz a definição das Vigilâncias Sanitária e Epidemiológica:

Art. 6º - Estão incluídas ainda no campo de atuação do Sistema Único de Saúde (SUS):

I - a execução de ações:

- a) de vigilância sanitária;
 - b) de vigilância epidemiológica;
 - c) de saúde do trabalhador; e
 - d) de assistência terapêutica integral, inclusive farmacêutica.
- (...)

§ 1º - Entende-se por vigilância sanitária um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde.

(...)

§ 2º - Entende-se por vigilância epidemiológica um conjunto de ações que proporcionam o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças ou agravos.

A partir dos anos 70, foram formuladas e implementadas propostas dirigidas à montagem de “sistemas de Vigilância Epidemiológica”, permitindo a adoção de decisões e a execução de ações de investigação e de controle (TEIXEIRA; PAIM; VILASBÔAS, 2000). Segundo o Guia de Vigilância Epidemiológica (BRASIL, 2002a), são imprescindíveis o planejamento e a execução do Programa de Investigações Epidemiológicas de Casos e Epidemias. Este programa tem como objetivos: identificar fonte e modos de transmissão; grupos expostos a maior risco; fatores determinantes; confirmar o diagnóstico e determinar as principais características epidemiológicas, orientando medidas de controle para impedir a ocorrência de novos casos.

A Vigilância Ambiental em Saúde é um conjunto de ações que proporcionam o conhecimento e a detecção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente e que interferem na saúde humana, com a finalidade de identificar as medidas de prevenção e controle dos fatores de riscos ambientais, relacionados às doenças ou outros agravos à saúde (BRASIL, 2002b).

A atuação da Vigilância Ambiental em Saúde, em todos os níveis de governo, requer articulação constante com os diferentes atores institucionais públicos, privados e com a comunidade, para que as ações integradas sejam implementadas de forma eficiente, a fim de assegurar que os setores assumam suas responsabilidades de atuar sobre os problemas de saúde e de ambiente em suas respectivas áreas (BRASIL, 2002b).

1.6.1 Vigilância das Paralisias Flácidas Agudas

A persistência dos casos de poliomielite em outros continentes, com o permanente risco de importação de poliovírus selvagem, justifica a permanência da estratégia dos dias nacionais de vacinação e o fortalecimento da vigilância epidemiológica dos casos de PFA. As estratégias fundamentais para manutenção da erradicação são o alcance de coberturas vacinais adequadas de forma homogênea em todo o território nacional e o cumprimento de metas adequadas dos indicadores de vigilância epidemiológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE).

A vigilância de PFAs consiste na notificação e investigação cuidadosa dos casos, com coleta de amostras de fezes de pacientes sintomáticos e contactantes, quando necessário, e na análise virológica das amostras em laboratórios credenciados à rede global de laboratórios da OMS (HOVI, 2006). Sabe-se que apenas 1% dos indivíduos infectados por poliovírus desenvolvem a paralisia (HOVI et al, 2012).

Por esta razão, a circulação de poliovírus selvagens e/ou PVDVs pode não ser detectada pela vigilância de PFAs nos casos assintomáticos. Para suprir esta limitação, faz-se necessária uma vigilância ambiental de poliovírus.

1.6.2 Vigilância Ambiental dos poliovírus

O contínuo crescimento populacional tem provocado crescente demanda por águas de consumo, de recreação e para irrigação de culturas agrícolas. Esse crescimento da população gerou um aumento na produção de águas residuárias ou esgotos, principalmente de esgoto doméstico. Consequentemente, aumentou-se a exposição do homem aos esgotos lançados no meio ambiente, particularmente nos corpos d'água, como córregos, rios, lagos e represas (CHERNICHARO et al, 2001).

O esgoto doméstico é uma combinação de excretas de humanos e animais (fezes e urina) e águas cinza, resultantes de lavagens, banhos e cozimento, além de esgoto proveniente do comércio e de algumas indústrias (BITTON, 1997; BARRELLA 2008 apud COZAC; MIRANDA, 2009). Fazem parte da composição do esgoto doméstico: água, sólidos orgânicos (nutrientes, proteínas, carboidratos e

lipídeos) e inorgânicos (amônia, nitrato e ortofosfatos), além de outros elementos e microrganismos (METCALF; EDDY, 2003; ZORATTO, 2006 apud COZAC; MIRANDA, 2009). Alguns constituintes presentes no esgoto doméstico representam risco à saúde humana e aos recursos hídricos. Determinadas doenças virais podem ser adquiridas após o consumo de águas ou alimentos contaminados por águas residuárias (COZAC; MIRANDA, 2009).

Por serem eliminados pelas fezes humanas em grandes quantidades, poliovírus e enterovírus não-pólio são capazes de contaminar direta ou indiretamente águas destinadas ao consumo humano. A presença desses vírus em águas ou alimentos contaminados por resíduos fecais, provenientes de descargas de águas residuárias, tem contribuído para a ocorrência de infecções em indivíduos suscetíveis (APPLETON, 2000; ABBASZADEGAN, 2001; WYN-JONES; SELLWOOD, 2001; LECLERC et al, 2002 apud COZAC; MIRANDA, 2009).

Esses vírus podem permanecer viáveis e infecciosos por vários meses em águas residuárias, resistindo a condições ambientais adversas, embora não sejam capazes de se replicarem nesse ambiente por serem parasitas intracelulares obrigatórios (MARQUES, 1991; APPLETON, 2000; ABBASZADEGAN, 2001; MEHNERT, 2001; SCHVOERER et al, 2001; LECLERC et al, 2002 apud COZAC; MIRANDA, 2009).

O monitoramento da circulação desses vírus na população pode ser feito através de uma vigilância, partir de amostras ambientais.

A vigilância ambiental dos poliovírus é epidemiologicamente importante, pois reflete as propriedades dos vírus circulantes na comunidade (SHULMAN et al, 2000), avalia o risco potencial de infecção a partir do meio ambiente e de alimentos (JAYKUS, 1997) e, avalia a eficiência das campanhas de imunização para eliminação do tipo selvagem, especialmente durante os últimos estágios para a erradicação da poliomielite (DESHPANDE; SHETTY; SIDDIQUI, 2003).

Esta vigilância baseia-se no fato de que indivíduos infectados por poliovírus, sintomáticos ou não, excretam grandes quantidades de partículas virais nas fezes por várias semanas (WHO, 2003). A quantidade de vírus excretados nas fezes é variável, podendo chegar até 10^7 partículas virais/dia por pessoa (HOVI et al, 2012). Em alguns casos, pode ser mais sensível que a vigilância das PFAs, a qual é feita somente nos casos suspeitos que representam uma porcentagem bastante

reduzida em relação ao total de indivíduos infectados excretando poliovírus no meio ambiente.

Em 2010, a OMS incluiu, no Plano Estratégico da Iniciativa de Erradicação Global da Pólio 2010-2012, a vigilância ambiental dos poliovírus como uma ferramenta suplementar à vigilância de PFA (WHO, 2010). Dessa forma, é possível monitorar a circulação de poliovírus selvagens e/ou PVDV em amostras ambientais supostamente contaminadas por fezes humanas, mesmo na ausência de casos de PFA (HOVI, 2006; HOVI et al, 2012).

A vigilância ambiental de poliovírus envolve, portanto, a busca destes vírus em amostras de efluentes de esgotos, sendo considerada eficiente na detecção da circulação de poliovírus selvagens e/ou PVDVs no ambiente, mesmo na ausência de paralisias. Além disso, é capaz de detectar a reintrodução de vírus selvagens em países considerados livres de pólio (HOVI, 2006; WHO, 2003).

O manual da OMS (WHO, 2003) recomenda que a coleta de amostras seja realizada no local de convergência do principal tronco coletor da rede de esgoto que abastece a população-alvo.

Recomenda-se que, nos casos de grandes cidades, a população seja segmentada em subgrupos e a coleta seja realizada em cada segmento, a fim de se realizar um monitoramento adequado e mais abrangente da circulação de vírus. Acredita-se que, sob condições urbanas, o poliovírus espalhe-se mais facilmente entre a população suscetível (WHO, 2003).

Portanto, essa vigilância tem sido usada com sucesso como uma ferramenta suplementar na avaliação da extensão ou duração de epidemias de transmissão de poliovírus em uma população específica e no monitoramento da circulação silenciosa de PVDVs, bem como de poliovírus selvagens, na ausência de casos relatados de PFAs (WHO, 2003).

2 JUSTIFICATIVA

O Brasil apresenta altos índices de cobertura vacinal para a poliomielite (média nacional acima de 95%), porém estes índices não ocorrem de forma homogênea, havendo regiões e/ou municípios com índices abaixo do desejado (BRASIL, 2012c).

Estes bolsões de indivíduos suscetíveis podem favorecer tanto a reintrodução dos vírus selvagem a partir de países endêmicos quanto à transmissão de poliovírus vacinais de pessoa a pessoa, facilitando emergência dos PVDVs. Torna-se, portanto, necessária a manutenção de altas coberturas vacinais de forma homogênea (BRASIL, 2012c).

Os poliovírus selvagens ainda permanecem endêmicos em três países (Afeganistão, Paquistão e Nigéria) e foram reintroduzidos em países previamente erradicados como a Somália e o Quênia (GPEI, 2013a).

A não ocorrência de poliomielite por poliovírus selvagens no Brasil não é suficiente para afastar seu risco, uma vez que a doença ainda circula em outros países e pode ser reintroduzida através de viajantes infectados em regiões que apresentam bolsões de pessoas não vacinadas (BRASIL, 2012c). O Brasil mantém comércio e transporte frequentes com países que reintroduziram o fenótipo selvagem.

Como >90-95% das infecções pelos poliovírus ocorrem de forma inaparente, a vigilância ambiental tem sido utilizada como complemento e suplemento à vigilância epidemiológica dos casos de PFA em vários países. A vigilância ambiental visa detectar a circulação de poliovírus selvagens e/ou PVDVs na ausência ou presença de altas concentrações de poliovírus vacinais no esgoto em populações vacinadas com VOP, uma vez que estes vírus podem circular silenciosamente no ambiente na ausência de casos relatados de PFAs (MANOR, 2007).

Em raros casos, a circulação de PVDVs resulta em cepas com capacidade de reversão da neurovirulência, as quais podem ser detectadas no esgoto meses antes do primeiro caso de poliomielite ser detectado (KEW et al, 2002; DESHPANDE, J.M.; SHETTY, S.J.; SIDDIQUI, Z.A., 2003; LODDER et al, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer a vigilância ambiental de poliovírus em apoio às atividades e monitoramento da erradicação global da poliomielite no Laboratório de Enterovírus/ Centro de Referência Nacional para Enterovirose, Rio de Janeiro, pelo isolamento e caracterização destes vírus em águas residuárias.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o monitoramento semanal de águas residuárias da ETE Alegria/Cedae, localizada no município do Rio de Janeiro, para isolamento e identificação de poliovírus e enterovírus não-pólio.
- Investigar a presença de PVDVs circulantes pela análise do nível de estabilidade genética dos poliovírus detectados frente às cepas vacinas de referência (Sabin 1, 2 e 3).
- Caracterizar os enterovírus não-pólio isolados para identificar a circulação destes vírus no ambiente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

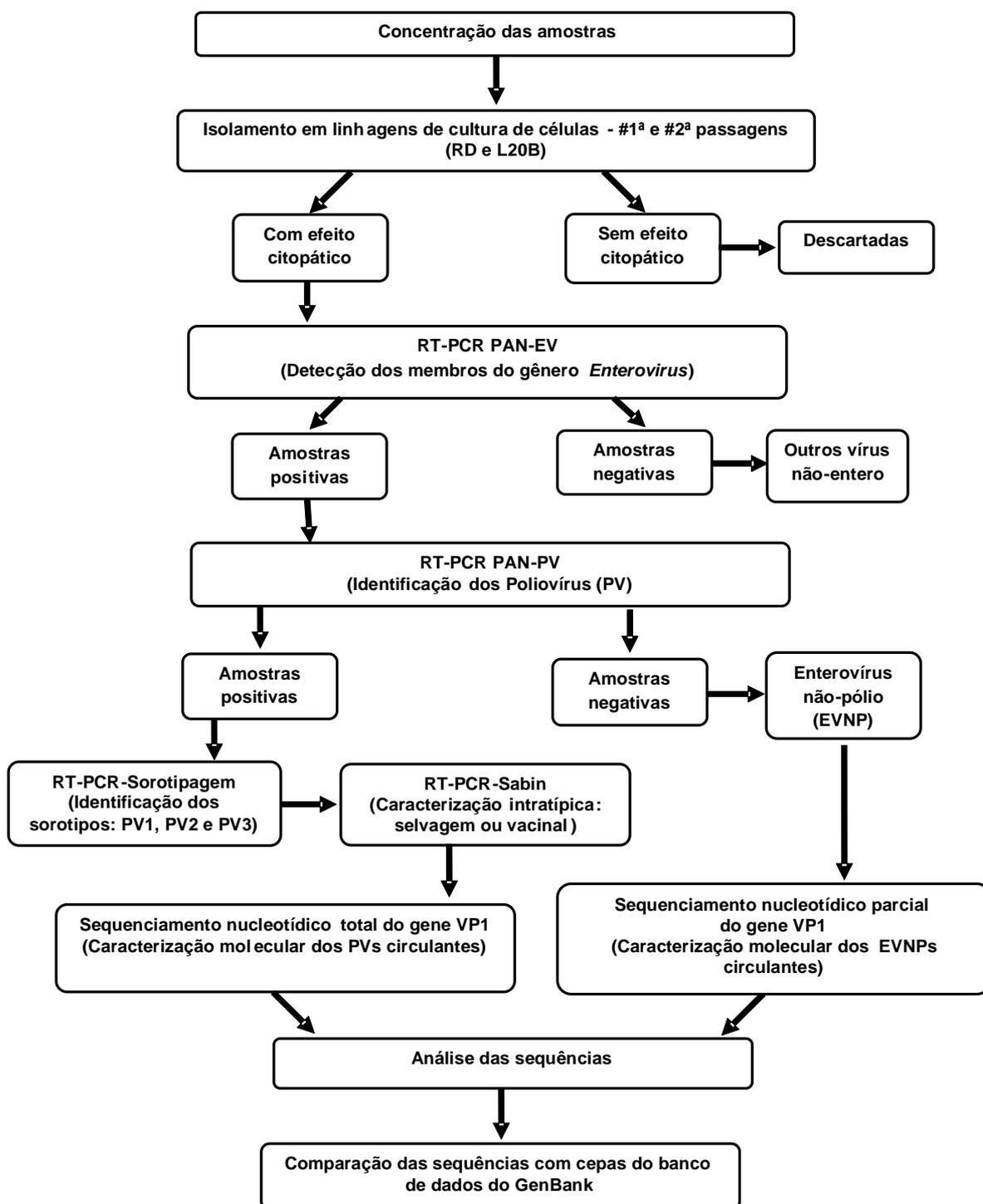
Para estabelecimento da vigilância ambiental de poliovírus e enterovírus não-pólio, inicialmente foram realizados experimentos para avaliação de três diferentes métodos de concentração viral: i) separação em duas fases; ii) precipitação por PEG; iii) adsorção por sílica, sendo o primeiro recomendado pelo manual de vigilância ambiental da circulação de poliovírus da OMS (WHO, 2003).

Posteriormente, estes métodos foram avaliados no campo, a fim de se eleger aquele a ser utilizado na vigilância ambiental.

Em seguida, foram realizadas coletas semanais de águas residuárias em uma ETE no município do Rio de Janeiro, nos anos de 2011 e 2012, incluindo uma coleta durante o período de Campanha Nacional de Vacinação (junho de 2012).

Para processamento das amostras, em todas as etapas do estudo, foram utilizadas metodologias de detecção de poliovírus e enterovírus não-pólio, previamente estabelecidas pela OMS (WHO, 2004), conforme fluxograma (**Figura 8**).

Figura 8 - Fluxograma do processamento das amostras no laboratório.



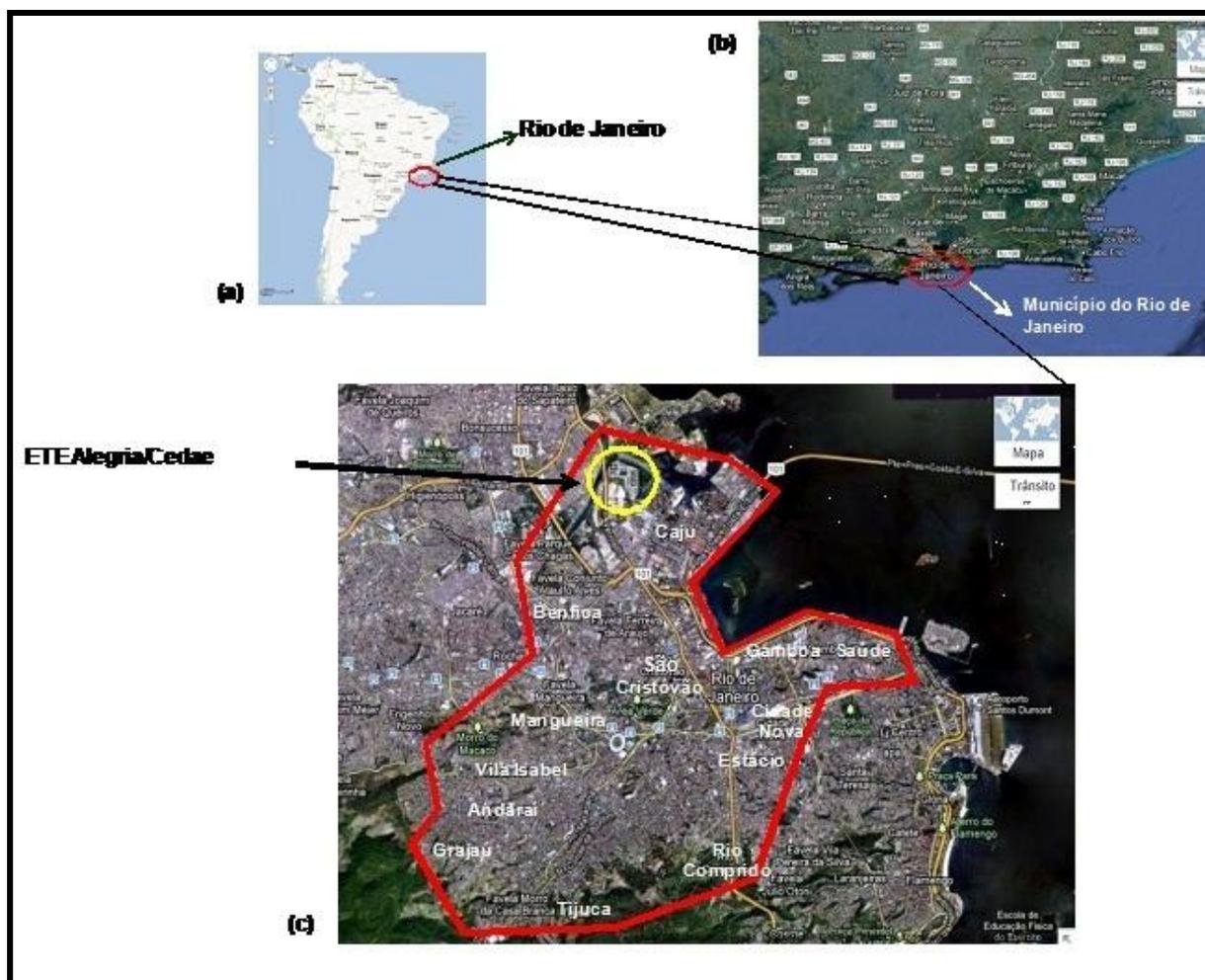
4.2 ÁREA DE ESTUDO

O município do Rio de Janeiro possui uma área de 1.200 km² e uma população estimada em 6.390.290 habitantes (IBGE, 2013). Está dividido em 160 bairros (IBGE, 2013) e, atualmente, conta com seis ETEs operadas pela Cedae (ETE Alegria; ETE Barra da Tijuca; ETE Constantino Arruda Pessôa; ETE Ilha do Governador; ETE Pavuna e ETE Penha).

Neste estudo, foi definido como local de coleta a ETE Alegria, em função do tamanho da população beneficiada por esta estação (aproximadamente 1,5 milhão de habitantes) e de sua proximidade com a Fiocruz. Para tanto, foi necessária a aprovação do 3º Termo Aditivo ao Acordo de Cooperação Técnica celebrado entre a Fiocruz e a Cedae, sob nº 39/2009. O 3º Termo Aditivo, sob o nº 25 380.003142/2009-79, assinado em novembro de 2011, tem por finalidade a “Vigilância ambiental de poliovírus em apoio às atividades de erradicação global da poliomielite”, vinculado ao Laboratório de Enterovírus (LEV), do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (**Anexo A**). O Termo foi publicado no Diário Oficial da União, em 04 de janeiro de 2012 (**Anexo B**).

A ETE Alegria, localizada no bairro do Caju, tem capacidade para receber e tratar até 2500L de esgotos por segundo e beneficia uma população de 1,5 milhão de habitantes. Os esgotos são coletados de uma área de cerca de 8600 hectares, de bairros da Zona Norte e Centro do município, subdivididos em quatro sub-bacias principais: o Conjunto Centro, Mangue e Catumbi; Alegria; Faria-Timbó e São Cristóvão. É uma estação projetada para tratamentos primário e secundário e promove a remoção das substâncias poluentes, alcançando uma eficiência de remoção de carga orgânica, eliminando os lançamentos *in natura* na Baía de Guanabara e nos rios e canais urbanos. (COMPANHIA ESTADUAL DE ÁGUAS E ESGOTOS). A **Figura 9** apresenta os bairros beneficiados pela ETE Alegria e sua localização no município do Rio de Janeiro.

Figura 9 - Fotos de satélite da cidade do Rio de Janeiro, apresentando os bairros beneficiados pela Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Alegria e sua localização no município do Rio de Janeiro.



(a) círculo vermelho: estado do Rio de Janeiro. (b) círculo vermelho: município do Rio de Janeiro. (c) círculo amarelo: ETE Alegria; área em vermelho: bairros beneficiados pela ETE Alegria.

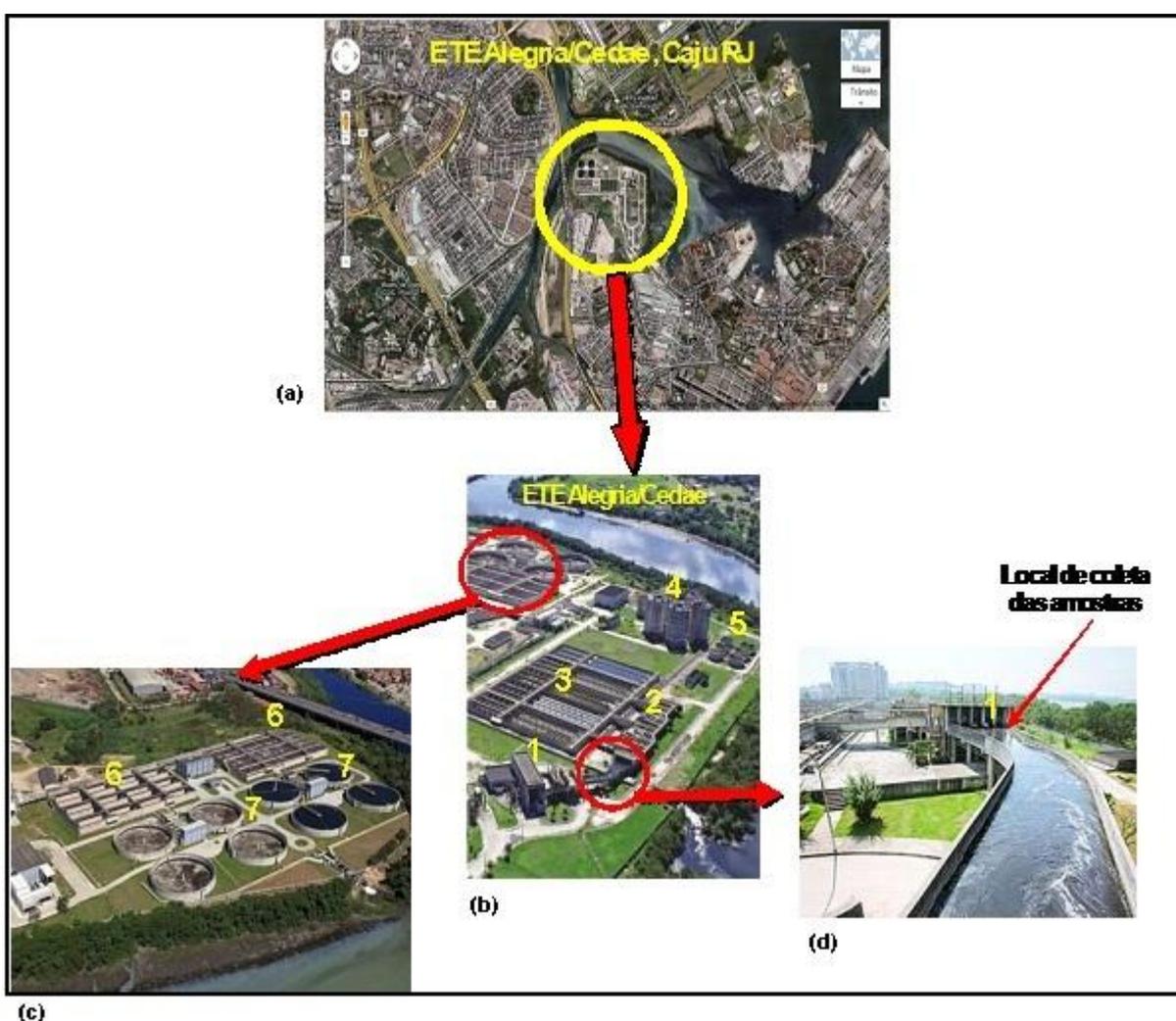
Fonte: Disponível em: <<http://maps.google.com.br/?ll=-22.902743,-43.209229&spn=1.325727,2.554321&t=h&z=9>>. Acesso em: 20/01/2013. Adaptado por Pereira, 2013.

4.2.1 Amostras de águas residuárias

Foram realizadas 31 coletas compostas de amostras de afluente de entrada da ETE, pelo método *Grab* — coletadas realizadas em um dado instante e que, em decorrência disso, refletem as condições do momento — de acordo com instruções contidas no manual da OMS (2003). Com base na planta da rede coletora, foi selecionado como local de coleta o ponto de convergência do tronco coletor da rede, situado antes do início do processo de tratamento (**Figura 10**).

As coletas foram realizadas semanalmente no período de dezembro de 2011 a junho de 2012 e de setembro a dezembro de 2012. Foram obtidas amostras compostas de 3L pela coleta de alíquotas de 750 mL a cada duas horas, durante o período de oito horas. As amostras foram armazenadas em recipientes de plástico estéreis e mantidas sob refrigeração até o envio ao Laboratório de Enterovírus do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fiocruz.

Figura 10 - Visualização panorâmica da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Alegria. Local de coleta das amostras (afluente de entrada).



(a) círculo amarelo: visão de satélite da ETE Alegria. (b) 1- elevatória principal; 2- caixas de remoção de areia; 3- decantadores primários; 4- digestores; 5- adensadores. (c) 6- tanques de aeração; 7- decantadores secundários. (d) 1- local de coleta das amostras - afluente de entrada do tratamento.

Fonte: Disponível em: <<http://www.cedae.rj.gov.br>>. Acesso em: 20/01/2013. Adaptado por Pereira, 2013.

4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS

4.3.1 Concentração das amostras

Neste estudo, foram realizados três métodos de concentração de vírus a partir de amostras de esgoto. O manual da OMS (WHO, 2003) recomenda que seja utilizado o método de separação em duas fases, descrito por ALBERTSON (1967), com modificações constantes no mesmo manual.

Todos os métodos de concentração foram previamente avaliados por experimentos de recuperação de PV1 Sabin e seus resultados analisados de acordo com as recomendações constantes no manual da OMS (WHO, 2003).

De modo geral, uma quantidade conhecida de poliovírus-padrão tipo 1 (PV1) Sabin foi inoculada em 500 mL de amostra de esgoto. A mistura foi concentrada de acordo com cada método e o concentrado foi analisado para poliovírus. Este procedimento foi realizado para cada método separadamente. Os detalhes estão descritos a seguir:

- a. Diluições seriadas 1:10 foram realizadas de um poliovírus-padrão PV1 Sabin com título: $10^{7,5}$ TCID₅₀/0,1 mL, de acordo com o Manual de Diagnóstico da Rede de Laboratórios de Referência para Poliomielite da OMS (WHO, 2004).
- b. Foi realizado o cálculo da diluição que contivesse 20 TCID₅₀ do vírus-padrão e o volume a ser adicionado em 500 mL de amostra de esgoto. Foi feita uma titulação padrão do vírus-padrão em microplacas, como descrito no manual da OMS (WHO, 2004).
- c. Um litro de amostra de esgoto foi dividido em duas partes de 500 mL cada. Em uma parte de 500 mL da amostra, foram adicionados 20 TCID₅₀ do vírus-padrão de PV1 Sabin (inoculado PV1 Sabin). Na parte restante não foi adicionado o vírus-padrão PV1 Sabin (controle). Ambas as partes foram concentradas normalmente seguindo o protocolo do método de concentração.
- d. O concentrado do inoculado PV1 Sabin e o concentrado do controle foram clarificados com clorofórmio (itens 4.3.1.1; 4.3.1.2 e 4.3.1.3). Após

a clarificação, foram realizadas duas diluições 1:3 (0,7 mL em 1,4 mL) e 1:10 (0,2 mL em 1,8 mL) somente do concentrado inoculado em meio essencial de Eagle contendo 2% de soro fetal bovino (Life-Technologies). As alíquotas das diluições foram armazenadas estocadas a - 20°C para uso posterior.

- e. O concentrado inoculado PV1 Sabin e o concentrado controle foram inoculados em duas linhagens celulares: células originárias de rhabdomiosarcoma humano (RD), permissivas à infecção por enterovírus e células L de camundongo geneticamente modificadas (L20B), que expressam um receptor humano para poliovírus. As células foram fornecidas pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta, USA) ao Laboratório de Enterovírus da Fiocruz/RJ. O procedimento de cultivo das linhagens celulares e de preparo das garrafas (25cm², Nalgene), contendo as monocamadas celulares para isolamento viral, está descrito no item 4.3.2.
- O concentrado inoculado PV1 Sabin foi inoculado em um volume de 0,5 mL em cinco garrafas de L20B (25cm², Nalgene) e em uma garrafa de RD (25cm², Nalgene).
 - O concentrado controle foi inoculado no mesmo volume acima em duas garrafas de L20B (25cm², Nalgene) e em uma garrafa de RD (25cm², Nalgene).
 - As garrafas foram incubadas a 37°C e leituras diárias foram realizadas, com auxílio de microscópio invertido, por um período de cinco a sete dias para observação de possível efeito citopatogênico (ECP) de 75-100%.
- f. Após este período, as amostras das garrafas, que apresentaram ECP característico de enterovírus, foram submetidas a testes moleculares para confirmação de isolamento do sorotipo inoculado (PV1 Sabin).
- g. Os resultados foram analisados de acordo com as seguintes recomendações constantes no Manual para Vigilância Ambiental da Circulação de Poliovírus da OMS (WHO, 2003):
- Ao menos duas garrafas das seis inoculadas com o concentrado inoculado PV1 Sabin deveriam revelar PV1 Sabin, se a titulação

mostrasse que a quantidade utilizada do vírus-padrão para o experimento de recuperação viral foi calculada de forma correta. Se não fosse encontrado PV1 Sabin em nenhuma das seis garrafas, o experimento deveria ser repetido com 100 TCID₅₀.

- Se PV1 Sabin fosse encontrado também em uma das três garrafas inoculadas com o concentrado controle, ou se todas as seis garrafas inoculadas com o concentrado inoculado PV1 Sabin revelassem PV1 Sabin, o isolamento com o concentrado inoculado Pv1 Sabin deveria ser repetido, utilizando-se as diluições 1:3 e 1:10 armazenadas. Cada diluição deveria ser inoculada em duas garrafas de L20B e em uma garrafa de RD.

Após a validação de cada método, as amostras foram processadas seguindo o fluxograma já descrito (item 4.2), de acordo com o andamento do estudo.

4.3.1.1 Método de separação em duas fases

Este método utiliza dois polímeros hidrofílicos: polietilenoglicol (PEG) e dextrana e equivale ao descrito por ALBERTSON (1967), com algumas modificações descritas por LEWIS e METCALF (1988) e GREENING e colaboradores (2002).

Foram utilizados 1000 mililitros (mL) de amostra de esgoto. Quinhentos mililitros foram armazenados a 4°C para uso posterior, caso precisasse repetir o procedimento. Os 500 mL restantes foram aliqüotados em tubos cônicos de centrífuga de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 1000 x g por 10 min a 4°C em centrífuga refrigerada (modelo CT 5500DR - CIENTEC). O sobrenadante de cada tubo foi transferido para um frasco de vidro estéril de 1000 mL. Os tubos contendo os *pellets* foram guardados a 4°C, para uso posterior. O pH do sobrenadante foi ajustado para 7,0-7,5, com solução de NaOH 1N, adicionada aos poucos. Ao volume de 500 mL de sobrenadante, foram adicionados: 39,5 mL de solução de dextrana a 22% (40g de Dextrana - massa molecular: ~40.000, Sigma + 142 mL de água tipo 2 estéril); 287 mL de solução de PEG 6000 a 29% (363g de PEG 6000 - massa molecular: ~6.000, Sigma + 888 mL de água tipo 2 estéril) e 35 mL de solução de NaCl 5N. A mistura foi homogeneizada completamente e mantida por

1h a 4°C, sob agitação constante, com auxílio de um agitador magnético. A mistura foi transferida para um funil de separação cônico de vidro estéril de 1000 mL e mantida *overnight* a 4°C. No dia seguinte, foi observada a formação de duas fases: superior (contendo o PEG) e inferior (contendo a dextrana), além de uma interfase. Com cuidado, por gotejamento, foram coletadas a fase inferior e a interfase em um frasco de vidro estéril de 50 mL (aproximadamente de 7-10 mL). O volume coletado foi utilizado para ressuspender os *pellets* dos tubos mantidos a 4°C do dia anterior. A ressuspensão foi transferida para um tubo cônico de centrífuga de 15 ou 50 mL e seu volume total foi verificado (aproximadamente 11-12 mL). A amostra foi clarificada com 20% de clorofórmio (v/v). O tubo foi homogeneizado por 1 min e centrifugado a 3000 rpm por 30 min a 4°C em centrífuga refrigerada (modelo CT 5500DR - CIENTEC). Ao sobrenadante, foram adicionados 10 µL de antibióticos estreptomicina/penicilina (10.000 UI/mL estreptomicina/10.000 µg/mL penicilina; GIBCO). Dois mililitros foram aliqotados em um microtubo de 1,5 mL e armazenados a 4°C, para posterior inoculação em culturas celulares. O restante do sobrenadante foi aliqotado em criotubos de 2 mL e armazenado a -20°C como estoque.

4.3.1.2 Método de precipitação por PEG

O método foi realizado com algumas modificações do método descrito por SHIEH e colaboradores (1995).

Ao volume 500 mL de amostra de esgoto, foram adicionados PEG 8000 a 8% (40g, Sigma) e cloreto de sódio (NaCl) a 1,75% (8,76g, Sigma). A amostra foi homogeneizada lentamente por 10 min a 4°C, com auxílio de um agitador magnético. O pH foi ajustado para 7,0-7,5, com solução de NaOH 1N, adicionada aos poucos. A amostra foi aliqotada em tubos de centrífuga de 250 mL (Nalgene®) e deixada a 4°C *overnight* para precipitação. No dia seguinte, foi centrifugada a 6500 rpm por 30 min a 4°C em centrífuga refrigerada (modelo RC5C - Sorvall). O sobrenadante contendo PEG foi descartado e os *pellets* foram ressuspensos em 8 mL de tampão fosfato-salina (PBS) 1X. A ressuspensão foi transferida para um tubo de centrífuga de 50 mL e seu volume total foi verificado (aproximadamente 12-13 mL). A amostra foi clarificada adicionando o mesmo volume de clorofórmio, para

redução de contaminação microbiana. O tubo foi homogeneizado vigorosamente por 1 min e centrifugado a 3000 rpm por 30 min a 4°C em centrífuga refrigerada (modelo CT 5500DR - CIENTEC). O sobrenadante foi transferido para um frasco de vidro estéril de 1000 mL. Por aproximadamente duas horas, o sobrenadante foi mantido em gelo, dentro da cabine de segurança biológica classe 2 (NBII), para a evaporação total do clorofórmio. Após este período, foram adicionados 100 µL de antibióticos estreptomicina/penicilina (10.000 UI/mL estreptomicina/10.000 µg/mL penicilina; GIBCO). Dois mililitros da amostra foram aliqüotados em um microtubo de 1,5 mL e armazenados a 4°C, para posterior inoculação em culturas celulares. O restante da amostra foi aliqüotado em criotubos de 2 mL e armazenado a -20°C como estoque.

4.3.1.3 Método de adsorção por sílica

Este método foi realizado com modificações dos protocolos descritos por LEISINGER ((1997); BAGGI (2001) e van HEERDEN (2005) apud ZURBRIGGEN et al, 2008).

Ao volume de 500 mL de amostra de esgoto, foram adicionados 500 µL de solução estoque de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 500 mM (concentração final de 0,5 mM). O pH foi ajustado para 3,5 com HCl 1N. Foram adicionados 250 µL de dióxido de silício (SiO_2) (BOOM, 1990). A amostra foi homogeneizada por 30 min a 4°C, com auxílio de um agitador magnético. Em seguida, foi aliqüotada em tubos de centrífuga de 50 mL e centrifugada a 1500 x g por 5 min a 4°C em centrífuga refrigerada (modelo CT 5500DR - CIENTEC). O sobrenadante foi descartado e os *pellets* ressuspensos em 3 mL de solução de glicina (Sigma) a 50 mM (pH 9,5) contendo 3% de extrato de carne (Sigma). O tubo foi homogeneizado vigorosamente por 20 min e centrifugado a 1500 x g por 5 min a 4°C em centrífuga refrigerada (modelo CT 5500DR - CIENTEC). O sobrenadante foi transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL. O pH do sobrenadante foi ajustado para 7,5 com NaOH 1N. Foram realizadas três etapas de clarificação com clorofórmio, descritas a seguir: adição de 3 mL de clorofórmio; homogeneização por 10 min e centrifugação a 1500 x g por 5 min a 4°C em centrífuga refrigerada (modelo CT 5500DR - CIENTEC). Após a centrifugação da terceira etapa de clarificação, o

sobrenadante foi transferido para um novo tubo de centrifuga de 15 mL. Foram adicionados, para cada mL de amostra, 10 µL de antibióticos estreptomicina/penicilina (10.000 UI/mL estreptomicina/10.000 µg/mL penicilina; GIBCO). Dois mL foram aliquoteados em um microtubo de 1,5 mL e armazenados a 4°C, para posterior inoculação em culturas celulares. O restante da amostra foi aliquoteado em criotubos de 2 mL e armazenado a -20°C como estoque.

4.3.2 Culturas Celulares

Foram utilizadas células originárias de rhabdomiosarcoma humano (RD), sensíveis ao isolamento do gênero *Enterovirus* e células L de camundongo geneticamente modificadas (L20B), que expressam um receptor humano para poliovírus. As células foram fornecidas pelo CDC/Atlanta, USA ao Laboratório de Enterovírus da Fiocruz/RJ.

As monocamadas celulares de RD e L20B foram mantidas e propagadas em garrafas de poliestireno (75 cm², Nalgene) transparentes, estéreis e descartáveis, em meio essencial de Eagle contendo 5% e 10% de soro fetal bovino, para as células RD e L20B, respectivamente (Life Technologies). Os cultivos foram incubados a 36,5°C e observados ao microscópio invertido (Hund Wetzear) até a formação da monocamada completa (WHO, 2004).

As garrafas de células RD e L20B para isolamento viral foram preparadas separadamente. O meio de crescimento das monocamadas celulares foi desprezado e 2 mL de solução de tripsina 0,25% (Sigma) foram adicionados. A solução de tripsina permaneceu em contato com a monocamada celular até que esta se desprendesse da parede da garrafa. A solução de tripsina foi desprezada. A monocamada de células RD foi homogeneizada com meio essencial de Eagle acrescido de soro fetal bovino a 5%, enquanto que, a monocamada de células L20B, com meio essencial de Eagle acrescido de 10% de soro fetal bovino. Ambas foram cultivadas em garrafas de poliestireno (25 cm², Nalgene), estéreis e descartáveis com adição da suspensão celular contendo 10×10^5 células/mL RD e 10×10^5 células L20B. Os cultivos foram incubados a 36,5°C por 24 horas, até que apresentassem confluência de 70-85% para isolamento viral (WHO, 2004).

4.3.2.1 Isolamento viral em culturas celulares

Para a inoculação de cada amostra, foram utilizadas duas garrafas de células L20B e uma garrafa de células RD.

As amostras concentradas e clarificadas foram inoculadas em um volume de 0,5 mL em garrafas contendo monocamadas celulares de L20B e de RD. Para cada grupo de amostras inoculadas, foi utilizado um controle celular, servindo como padrão de controle negativo, sendo constituído apenas de células e meio essencial mínimo. As garrafas foram incubadas a 36,5°C e submetidas a leituras diárias de cinco a sete dias consecutivos, em microscópio invertido, para observação de ECP de 75-100%. Posteriormente, as amostras foram submetidas a dois ciclos de congelamento e descongelamento rápido, em gelo seco e álcool etílico, visando à liberação das partículas virais para uma segunda passagem em cultura celular. Novas leituras diárias por cinco a sete dias consecutivas foram realizadas para observação de ECP.

As garrafas que apresentaram ECP característico de enterovírus foram armazenadas a -20°C, para posterior identificação por RT-PCR.

O ECP característico de enterovírus é caracterizado por alterações morfológicas das células, as quais se tornam arredondadas, refrativas e deslocam-se da superfície da garrafa. As células L20B são altamente seletivas para poliovírus. Entretanto, alguns vírus não-pólio, como adenovírus e reovírus, também são capazes de induzir ECP nestas células. Alguns EVNP, como coxsakievírus tipo A, são isolados em L20B, induzindo ECP característico de enterovírus. As células de RD são suscetíveis ao isolamento de enterovírus (WHO, 2004).

4.3.3 Identificação dos vírus isolados por RT-PCR

4.3.3.1 Identificação dos enterovírus por RT-PCR PAN-EV

Os enterovírus isolados foram identificados pela técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCT). O par de iniciadores utilizados, EVR e EVF (anti-senso e senso, respectivamente), flanqueia a região terminal 5' não-codificante (NCR) do RNA, uma região conservada e

comum ao genoma de todos os enterovírus humanos conhecidos. Ambos são utilizados na rotina de diagnóstico do LEV e suas sequências estão apresentadas no item 4.3.5, **Quadro 3**. O tamanho esperado do produto é de 153 pares de bases (pb) (WHO, 2004).

A reação foi realizada seguindo o método descrito por YANG e seus colaboradores (1991), com a modificação de ser realizada pelo método *One Step*, conforme descrito a seguir: em um microtubo de 0,2 mL, foi adicionado 1 µL da suspensão celular contendo o vírus isolado. O tubo foi aquecido a 95°C por 3 min para inativação dos vírus. O tubo foi centrifugado rapidamente a 13400 rpm por 30 s, seguido de choque térmico em banho de gelo por 5 min. Após a inativação, foram adicionados 3,2 µL da mistura contendo 2,5 µL de tampão 10X para PCR (Invitrogen) e 0,7 µL do iniciador EVR a 5 pmoles/µL. A mistura foi aquecida a 95°C por 5 min em um termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems), para desnaturação do RNA e hibridização do iniciador. Em seguida, foi colocada em banho de gelo e centrifugada brevemente.

A esta mistura, foram adicionados 0,7 µL do iniciador EVF a 5 pmoles/µL; 0,5 µL de dNTP a 10 mM (100 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato - dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (dNTP's, Invitrogen); 0,15 µL de inibidor de RNase a 40U/ µL (*RNAsin*, Invitrogen); 0,2 µL de Transcriptase reversa a 20U/µL (*SuperScript II reverse Transcriptase*, Invitrogen); 0,2 µL de *Taq DNA polymerase* a 5U/µL (Invitrogen) e 19,5 µL de água deionizada e autoclavada (*Nuclease Free Water*, Promega) para completar um volume final de reação de 25 µL. A reação de RT-PCR PAN-EV foi realizada com uma etapa de transcrição reversa a 42°C por 30 min e inativação da transcriptase reversa a 95°C por 3 min; seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 s; de anelamento a 55°C por 45 s e de extensão a 70°C por 45 s e uma extensão final a 72°C por 7 min, em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems).

As reações foram acompanhadas por um controle negativo (água tipo 1 estéril) e por um controle positivo (vírus-padrão de poliovírus 1, poliovírus 2 ou poliovírus 3 recebidos do *National Institute for Biological Standards and Controls* (NIBSC)).

Os resultados foram analisados após a visualização dos produtos amplificados conforme descrito no item 4.3.3.2.

As amostras confirmadas como enterovírus foram submetidas à reação de RT-PCR PAN-PV para identificação de poliovírus. Já as amostras com resultados negativos foram consideradas como negativas para enterovírus, possivelmente sendo outros vírus não-enterovírus.

4.3.3.2 Visualização dos produtos amplificados por eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. Aos 11 µL do produto amplificado, foram acrescentados 2,0 µL de *Loading buffer* 6X (Invitrogen). A mistura foi aplicada nos poços do gel. Um marcador de peso molecular de 50 pb (Fermentas) foi utilizado como referência. A corrida eletroforética foi realizada a 100 V em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X por 90 min. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (concentração de 1 µg/mL). Os produtos da amplificação foram visualizados e capturados por um transiluminador (luz UV, modelo UNIVERSAL Hood II, BIORAD).

4.3.3.3 Identificação dos poliovírus por RT-PCR PAN-PV

Após a confirmação dos vírus isolados como pertencente ao gênero *Enterovirus*, foi realizada uma nova reação de RT-PCR, a fim de identificar se também eram poliovírus. Esta reação identifica os três sorotipos de poliovírus, tanto os fenótipos selvagens quanto os vacinais. Foram utilizados iniciadores específicos PANPVR e PANPVF a uma concentração de 50 pmoles/µL, os quais flanqueiam a região do gene que codifica a proteína VP1. Ambos são utilizados na rotina de diagnóstico do LEV e suas sequências estão apresentadas no item 4.3.5, **Quadro 3**. O tamanho esperado do produto é de 79 pb (WHO, 2004).

A reação foi realizada como descrito por YANG et al (1991; 1992), como algumas modificações. A metodologia utilizada para a construção do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) e posterior amplificação do mesmo foi a mesma utilizada para a reação de RT-PCR PAN-EV (item 4.6.1), com exceção dos iniciadores utilizados e dos ciclos de amplificação. A reação de RT-PCR PAN-PV

foi realizada com uma etapa de transcrição reversa a 42°C por 30 min e inativação da transcriptase reversa a 95°C por 3 min; seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 s; de anelamento a 42°C por 45 s e de extensão a 60°C por 45 s e uma extensão final a 72°C por 7 min, em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems).

As reações foram acompanhadas por um controle negativo (água tipo 1 estéril) e por um controle positivo (vírus-padrão de poliovírus 1, poliovírus 2 ou poliovírus 3 (NIBSC). A visualização dos produtos da amplificação foi realizada conforme descrito no item 4.3.3.2.

As amostras confirmadas como poliovírus foram submetidas a mais quatro reações de RT-PCR para identificação do sorotipo e para sua caracterização intratípica. As amostras com resultados negativos para esta reação foram consideradas enterovírus não-pólioP) e submetidas à identificação pelo sequenciamento nucleotídico parcial do gene que codifica a proteína VP1.

4.3.3.4 Identificação dos sorotipos dos poliovírus por RT-PCR Sorotipagem

Após a confirmação do vírus como poliovírus, foi realizada uma reação de RT-PCR para identificação do seu sorotipo.

As reações foram realizadas com algumas modificações dos procedimentos descritos por YANG et al (1991). Foram realizadas três reações (uma reação para cada sorotipo) e, em cada uma delas, foi adicionado somente um par de iniciadores específicos para cada sorotipo: para o sorotipo 1 (Sero1R e Sero1F)); para o sorotipo 2 (Sero2R e Sero2F) e para o sorotipo 3 (Sero3R e Sero3F). Os iniciadores flanqueiam a região do gene que codifica a proteína VP1. Os iniciadores são utilizados na rotina de diagnóstico do LEV e suas sequências estão apresentadas no item 4.3.5, **Quadro 3**. Os tamanhos esperados dos produtos são de: 70 pb (sorotipo 1); 79 pb (sorotipo 2) e 140 pb (sorotipo 3) (WHO, 2004).

Por serem degenerados, não foi possível fazer uma reação de *Multiplex* PCR, sendo necessário fazer três reações para cada amostra, utilizando, em cada uma delas, o par de iniciadores específicos para cada sorotipo.

Para esta reação, foi utilizado o Kit *Poliovirus Diagnostic PCR*, fornecido pelo CDC/Atlanta, USA. A reação de RT-PCR foi realizada de acordo com as instruções

constantes no kit, descritas a seguir: foram utilizados três microtubos de 0,2 mL para cada amostra (tubos 1, 2 e 3). No tubo 1, foram adicionados 1 µL da suspensão celular contendo o vírus isolado e 19 µL do *buffer A* (*Serotype 1*) fornecido pelo kit, contendo os iniciadores Sero1R e Sero1F. No tubo 2, foram adicionados 1 µL da suspensão celular contendo o vírus isolado e 19 µL do *buffer A* (*Setotype 2*) fornecido pelo kit, contendo os iniciadores Sero2R e Sero2F. No tubo 3, foram adicionados 1 µL da suspensão celular contendo o vírus isolado e 19 µL do *buffer A* (*Setotype 3*) fornecido pelo kit, contendo os iniciadores Sero3R e Sero3F. As misturas foram aquecidas a 95°C por 5 min em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems), para desnaturação do RNA e hibridização dos iniciadores. Em seguida, os tubos foram colocados em banho de gelo e centrifugados brevemente.

Em cada um dos três tubos, foram adicionados 5 µL do *buffer B*, fornecido pelo kit, contendo: 0,7 µL de Ditionotreitól a 1 M (*DTT*, Invitrogen); 6,9 µL de inibidor de RNase 40 U/µL (*RNAasin*, Promega); 4,5 µL de transcriptase reversa 20 U/µL (*SuperScript II*, Invitrogen) e 13,7 µL de *Taq* DNA polimerase 5U/µL (Invitrogen). A reação de transcrição reversa foi realizada a 42°C por 30 min com inativação da transcriptase reversa a 95°C por 3 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 s; de anelamento a 42°C por 45 s e de extensão a 60°C por 45 s e uma extensão final a 72°C por 7 min, em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems).

As reações foram acompanhadas por um controle negativo (água tipo 1 estéril) e por um controle positivo de cada sorotipo em tubos separados (vírus-padrão de poliovírus 1, poliovírus 2 e poliovírus 3 (NIBSC)). A visualização dos produtos da amplificação foi realizada conforme descrito no item 4.3.3.2.

4.3.3.5 Caracterização intratípica por RT-PCR Sabin

Após a identificação do sorotipo de cada amostra, foi realizada a caracterização intratípica da cepa como de origem selvagem ou vacinal pela técnica de RT-PCR Sabin.

A reação foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por YANG et (1991), com algumas modificações. Uma reação de RT seguida de *Multiplex*

PCR foi realizada utilizando-se três pares de iniciadores específicos para cada sorotipo vacinal: sorotipo Sabin 1 (Sabin1R e Sabin1F); sorotipo Sabin 2 (Sabin2R e Sabin2F) e sorotipo Sabin 3 (Sabin3R e Sabin3F). Os iniciadores flanqueiam a região do gene que codifica a proteína VP1. Os iniciadores são utilizados na rotina de diagnóstico do LEV e suas sequências estão apresentadas no item 4.3.5, **Quadro 3**. Os tamanhos esperados dos produtos amplificados são de: 97 pb (Sabin 1); 71 pb (Sabin 2) e 53 pb (Sabin 3) (WHO, 2004).

Para esta reação, foi utilizado o Kit *Poliovirus Diagnostic PCR*, fornecido pelo CDC/Atlanta, USA. A reação de RT-PCR foi realizada de acordo com as instruções constantes no kit, descritas a seguir: em um único microtubo de 0,2 mL foram adicionados 1 µL da suspensão celular contendo o vírus isolado e 19 µL do *buffer A* (Sabin) fornecido pelo kit, contendo os iniciadores: Sabin1R e Sabin1F; Sabin2R e Sabin2F e Sabin3R e Sabin3F. A mistura foi aquecida a 95°C por 5 min em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems), para desnaturação do RNA e hibridização dos iniciadores. Em seguida, o tubo foi colocado em banho de gelo e centrifugado brevemente.

Posteriormente, foram adicionados 5 µL do *buffer B* fornecido pelo kit, contendo: 0,7 µL de DTT 1M (Invitrogen); 6,9 µL de inibidor de RNase 40 U/µL (*RNAasin*, Promega); 4,5 µL de transcriptase reversa 20 U/µL (*SuperScript II*, Invitrogen) e 13,7 µL de *Taq* DNA polimerase 5U/µL (Invitrogen). A reação de transcrição reversa foi realizada a 42°C por 30 min com inativação da transcriptase reversa a 95°C por 3 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 s; de anelamento a 55°C por 45 s e de extensão a 70°C por 45 s e uma extensão final a 72°C por 7 min, em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems).

As reações foram acompanhadas por um controle negativo (água tipo 1 estéril) e por um controle positivo contendo, no mesmo tubo, os três sorotipos no (vírus-padrão de poliovírus 1, poliovírus 2 e poliovírus 3 (NIBSC). A visualização dos produtos da amplificação foi realizada conforme descrito no item 4.3.3.2.

A caracterização intratípica da cepa foi determinada de acordo com a interpretação dos resultados desta reação, ou seja, amostras positivas foram consideradas de origem vacinal ou *Sabin like*, enquanto que as amostras negativas, de origem selvagem.

A partir deste momento, seguiu-se a recomendação do manual da OMS para diagnóstico de poliovírus (WHO, 2004), o qual recomenda, após a caracterização intratípica, o sequenciamento nucleotídico do gene que codifica a proteína VP1 das amostras positivas para poliovírus.

4.3.4 Caracterização molecular dos poliovírus e enterovírus não-pólio circulantes

4.3.4.1 Extração do RNA viral

As amostras identificadas como PVs e EVNPs, pelas técnicas descritas nos itens 4.6.1 e 4.6.2, foram submetidas à extração de RNA utilizando-se o kit *QIAmp Viral RNA Mini*[®] kit (Qiagen, Santa Clarita, CA), de acordo com as instruções do fabricante.

Este método baseia-se na extração de RNA pelo método de BOOM (1990), precedida por uma etapa de desnaturação e precipitação de proteínas e remoção de outros contaminantes.

4.3.4.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

A síntese do cDNA foi realizada em três etapas: primeira etapa: em um microtubo de 0,2 mL, foram adicionados 9,0 µL do RNA extraído e 1,0 µL de iniciador *Random primer* (Promega) a 100 pmoles/µL para enterovírus não-pólio ou 1,0 µL de iniciador *Oligo-dT* (Promega) a 100 pmoles/µL, para amostras positivas para poliovírus. O tubo foi homogeneizado e a mistura incubada a 70°C por 10 min em termociclador (GeneAmp[®] PCR System 9700, Applied Biosystems). Na segunda etapa, no mesmo tubo, foram adicionados 4,0 µL de tampão 5X *first stand c-DNA* (Invitrogen); 2,0 µL de DTT 0,1 M (Invitrogen); 1,5 µL de dNTP's 10 mM/µL (Invitrogen); 0,5 µL de *RNAse out* 40 U/µL (Invitrogen) e 1,0 µL de água deionizada e autoclavada (*Nuclease Free Water*, Promega). O tubo foi homogeneizado e a mistura incubada a 42°C por 2 min. Na terceira etapa, foi adicionado 1,0 µL de transcriptase reversa 20U/µL (*SuperScript II reverse Transcriptase*, Invitrogen). A mistura foi submetida a 42°C por 50 min em

termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems). Ao final, o c-DNA foi armazenado a -20°C para uso nas reações em cadeia pela polimerase (PCR).

4.3.4.3 Reação de PCR para amplificação parcial do gene VP1 do genoma dos enterovírus não-pólio

As amostras consideradas enterovírus não-pólio foram sequenciadas para identificação dos vírus isolados.

Para cada amostra, a reação de PCR foi realizada com a adição, em um microtubo de 0,2 mL, de: 3 µL de cDNA sintetizado com *Random primer*; 25 µL de *Go Taq® Green Master Mix* (*Taq* DNA polimerase 1,25 U; 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 mM de MgCl₂; Promega); 1,0 µL do iniciador reverso 222 a 50 pmoles/µL; 1,0 µL de iniciador senso 292 a 50 pmoles/µL e 20 µL de água deionizada e autoclavada (*Nuclease Free Water*, Promega) para completar um volume final de reação de 50 µL. A reação foi submetida a 32 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s; de anelamento a 42°C por 30 s e de extensão a 60°C por 40 s, seguida de uma extensão final a 72°C por 7 min, em termociclador (*GeneAmp® PCR System 9700*, Applied Biosystems) (ORBESTE et al, 2000). Foi utilizado um controle negativo (todos os reagentes, sem o material genético). Não foi utilizado nenhum controle positivo para evitar contaminação.

Os iniciadores são utilizados na rotina de diagnóstico do LEV e suas sequências estão apresentadas no item 4.3.5, **Quadro 3** (ORBESTE et al, 2003). Ambos anelam-se a uma região do gene que codifica a proteína VP1, gerando um fragmento de 357 pb.

4.3.4.4 Reação de PCR para amplificação total do gene VP1 do genoma dos poliovírus

A amplificação do gene VP1 dos poliovírus foi realizada utilizando os iniciadores Q8 e Y7 (reverso e senso, respectivamente). Ambos são usados na rotina de diagnóstico do LEV e suas sequências estão apresentadas no item 4.3.5, **Quadro 3**. O tamanho esperado do produto amplificado é de 1100 pb.

Para esta reação, foram utilizados 3 μL de cDNA sintetizado com *Oligo-dT* na reação descrita no item 4.7.2; 25 μL de *Go Taq® Green Master Mix* (*Taq* DNA polimerase 1,25 U; 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 mM de MgCl_2 ; Promega); 1,0 μL do iniciador reverso Q8 a 50 pmoles/ μL ; 1,0 μL de iniciador senso Y7 a 50 pmoles/ μL e 20 μL de água deionizada e autoclavada (*Nuclease Free Water*, Promega) para completar um volume final de reação de 50 μL . A reação foi submetida incubada a 42°C por 30 min; 95°C por 3 min e 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 s; de anelamento a 42°C por 45 s e de extensão a 60°C por 45 s, seguida de uma extensão final a 72°C por 7 min, em termociclador (*GeneAmp® PCR System 9700*, Applied Biosystems). Foi utilizado um controle negativo (todos os reagentes, sem o material genético). Não foi utilizado nenhum controle positivo para evitar contaminação.

4.3.4.5 Visualização dos produtos amplificados por eletroforese em gel de agarose

Para visualização dos produtos da PCR, as amostras no volume de 50 μL foram acrescidas de 8,0 μL de *Loading buffer* 6X e aplicadas em gel de agarose a 1%, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X, contendo solução de brometo de etídio (concentração de 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), utilizando como marcador de peso molecular de 50 pb (*DNA Ladder* 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ – Invitrogen) como referência. A corrida de eletroforese foi realizada a 110 V em tampão TAE 1X por 60 min. Os produtos amplificados foram visualizados e capturados por um transiluminador (luz UV, modelo UNIVERSAL Hood II, BIORAD). As bandas foram cortadas e retiradas do gel de agarose para eluição do DNA.

4.3.4.6 Purificação do DNA

Os produtos da PCR compatíveis com o tamanho esperado (357 pb, para enterovírus não-pólio e 1100 pb, para poliovírus) foram extraídos do gel de agarose, purificados com o uso do Kit *QIAquick® Gel Extraction* (Qiagen), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Este método baseia-se na

capacidade de ligação do ácido desoxirribonucleico (DNA) à sílica presente na coluna, pela qual a amostra passou durante o processo de purificação.

As bandas de interesse foram excisadas do gel, com auxílio de bisturi e transferidas para tubos de 1,5 mL. Em seguida, em cada tubo foram adicionados 500 µL de tampão de solubilização (QG). Os tubos foram incubados a 50°C por 10 min em termobloco, com homogeneização a cada 3 min, durante a incubação. Após o gel ter sido totalmente dissolvido, foram adicionados 200 µL de isopropanol absoluto (Merck).

Em seguida, as misturas foram transferidas para as colunas dispostas sobre os tubos coletores de 2 mL e centrifugadas a 13200 rpm por 1 min (Centrifuge 5415D Eppendorf). Ao final da centrifugação, o filtrado foi descartado e mais 200 µL do tampão QG foram adicionados para remoção dos resíduos de agarose. As colunas foram centrifugadas novamente a 13200 rpm por 1 min. O filtrado foi descartado novamente.

Para a lavagem das colunas, contendo o DNA, foram adicionados 500 µL de tampão de lavagem (PE). As colunas foram centrifugadas a 13200 rpm e o filtrado descartado. Para garantir que todo resíduo de etanol do tampão PE fosse removido, as colunas foram novamente centrifugadas na mesma rotação e tempo.

As colunas foram transferidas para novos tubos de 1,5 mL estéreis devidamente identificados. O DNA foi eluído com a adição de 30 µL de tampão de eluição EB. Após a incubação por 1 min à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 13200 rpm por 1 min. As colunas foram descartadas e o DNA eluído foi concentrado para o volume de 20 µL (Concentrator 5301 Eppendorf). O DNA eluído foi armazenado a -20°C, para ser quantificado posteriormente.

4.3.4.7 Quantificação do concentrado de DNA dos produtos da PCR

Os produtos da PCR purificados foram quantificados por meio da comparação, em gel de agarose 1%, com um marcador de massa molecular (*Low DNA Mass Ladder*, Invitrogen),

Para a quantificação, foi utilizada uma mistura de 4 µL do DNA purificado; 2 µL de *Loading buffer* 6X e 6 µL de água deionizada autoclavada. As amostras foram aplicadas, juntamente com o marcador de massa molecular preparado de

maneira semelhante às amostras, em gel de agarose 1%, preparado com tampão TAE 1X corado com brometo de etídio (1 μ L da solução estoque a 10 mg/mL). A corrida eletroforética foi realizada a 90 V por 30-40 min em tampão TAE 1X.

As bandas esperadas foram visualizadas e capturadas em transiluminador (luz UV, modelo UNIVERSAL Hood II, BIORAD). Em seguida, a intensidade da banda de cada produto foi comparada com a do marcador de massa molecular, indicando a concentração de DNA contida em cada amostra.

4.3.4.8 Sequenciamento dos produtos da PCR

O volume de DNA de cada amostra utilizado nas reações de sequenciamento foi padronizado a partir da concentração do DNA eluído. Concentrações de 100 ng/ μ L de DNA foram suficientes para produzir eletroferogramas que forneceram leituras confiáveis das sequências. Foi utilizado o kit *ABI BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1* (PE Applied Biosystems), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

Na reação de sequenciamento, foram utilizados os mesmos iniciadores da reação de PCR para amplificação do DNA purificado, sendo que, cada iniciador (senso e reverso) foi adicionado em tubos separados.

O método de sequenciamento do kit *BigDye[®]* baseia-se na incorporação dideoxynucleotídeos (ddNTPs) marcados com fluorescência às cadeias de durante a reação.

4.3.4.9 Reações de sequenciamento dos produtos amplificados dos enterovírus não-pólio

Para esta reação, em cada tubo foram adicionados: o DNA purificado a ser sequenciado (na concentração de 100 ng/); 1,0 μ L do iniciador 222 a 5 pmoles/ μ L ou do iniciador 292 a 5 pmoles/ μ L; 2,0 μ L do tampão de sequenciamento fornecido pelo kit; 4,0 μ L do *Big Dye[®] Terminator* e água deionizada autoclavada, se necessário, para completar o volume final de 20 μ L. As reações foram realizadas em termociclador (GeneAmp[®] PCR System 9700, Applied Biosystems), com 25 ciclos de 96°C por 25 s; 42°C por 30 s e 60°C por 3 min.

4.3.4.10 Reações de sequenciamento dos produtos amplificados dos poliovírus

Nesta reação, foram adicionados, em cada tubo: o DNA purificado a ser sequenciado (na concentração de 100 ng/); 1,0 µL do iniciador Q8 a 5 pmoles/µL ou do iniciador Y7 a 5 pmoles/µL; 2,0 µL do tampão de sequenciamento fornecido pelo kit; 4,0 µL do *Big Dye*[®] *Terminator* e água deionizada autoclavada, se necessário, para completar o volume final de 20 µL. As reações foram submetidas à incubação de 25 ciclos a 96°C por 25 s; 50°C por 25 s; 60°C por 3 min, seguida de extensão final a 72°C por 7 min, em termociclador completar o volume final de 20 µL. As reações foram realizadas em termociclador (GeneAmp[®] PCR System 9700, Applied Biosystems).

4.3.4.11 Purificação dos produtos da reação de sequenciamento

Ao final da reação de sequenciamento, os produtos foram purificados por precipitação com isopropanol. Os produtos da reação (20 µL) foram transferidos para tubos de 1,5 mL. Em cada tubo, foram adicionados 80 µL de isopropanol a 75% (Merck). Os tubos foram brevemente agitados e incubados à temperatura ambiente por 20 min para precipitação, ao abrigo da luz.

Em seguida, foram centrifugados a 14000 rpm por 20 min a 8°C (Centrifuge 5451R Eppendorf). O sobrenadante foi removido cuidadosamente e adicionados mais 250 µL de isopropanol a 75%. Os tubos foram rapidamente agitados e centrifugados a 14000 rpm por 5 min a 8°C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado. O conteúdo dos tubos foi completamente seco a vácuo (Concentrator 5301 Eppendorf). O DNA foi armazenado, protegido da luz, a -20°C, até o momento do uso.

4.3.4.12 Sequenciamento e análise das sequências obtidas

As amostras purificadas foram ressuspensas em 20 µL de Hi-Di-formamida (Applied Biosystems), agitadas por 5 min e aquecidas a 95°C por 3 min para desnaturação do DNA e evitar a formação de estruturas secundárias.

As amostras foram entregues à Plataforma de Sequenciamento de DNA/PDTIS/Fiocruz.

As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas em sequenciador (3730XL DNA Analyser Hitachi, Applied Biosystems).

O alinhamento das sequências foi realizado com o uso do programa BioEdit 7.0 (HALL, 1999). Quando necessário, as sequências foram editadas e comparadas com as sequências previamente depositadas no banco de dados do *GenBank* pelo uso do programa BLASTN 2.2.27, para confirmação da identidade viral e do respectivo sorotipo (ALTSCHUL et al, 1990).

Após a identificação dos sorotipos virais, foram construídas as árvores filogenéticas pelo método de *Neighbor-Joining*, utilizando o programa MEGA versão 4.0.2 (TAMURA et al, 2007).

4.3.5 Iniciadores utilizados na reação de RT-PCR, PCR e sequenciamento nucleotídico

Quadro 3 - Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR, PCR e de sequenciamento nucleotídico e sua posição de anelamento no genoma viral.

Iniciadores	Sentido	Sequência (5' → 3')	Tamanho do Amplicon	Posição no genoma
EVR	Anti-senso	ATT GTC ACC ATA AGC AGC C	153 pb	599-581 ^b
EVF	Senso	CTC CGG CCC CTG AAT GCG GCT A	153 pb	445-466 ^b
PAN PVR	^a Anti-senso	TTI AII GCR TGI CCR TTR TT	79 pb	2934-2916 ^c
PAN PVF	^a Senso	CIT AIT CIM GIT TYG AYA TG	79 pb	2857-2876 ^c
Sero1R	^a Anti-senso	ATC ATICTY TCI ARC ATY TG	70 pb	2528-2509 ^d
Sero1F	^a Senso	TGC GIG AYA CIA CIC AYA T	70 pb	2459-2477 ^d
Sero2R	^a Anti-senso	AYICCY TCI ACI RCI CCY TC	79 pb	2537-2518 ^d
Sero2F	^a Senso	TGC GIG AYA CIA CIC AYA T	79 pb	2459-2477 ^d
Sero3R	^a Anti-senso	CCC CIA IpT GRT CRT TIK pRT C	140 pb	3176-3157 ⁱ
Sero3F	^a Senso	AAY CCI TCI RTI TTY TAY AC	140 pb	3037-3056 ^d
Sabin1R	Anti-senso	TCC ACT GGC TTC AGT GTT	97pb	2601-2584 ^e
Sabin1F	Senso	AGG TCA GAT GCT TGA AAG C	97pb	2505-2523 ^e
Sabin2R	Anti-senso	CGG CTT TGT GTC AGG C	71 pb	2595-2579 ⁱ
Sabin2F	Senso	CCG TTG AAG GGA TTA CTA AA	71 pb	2525-2544 ^e
Sabin3R	Anti-senso	AGT ATC AGG TAA GCT ATC C	53 pb	2560-2542 ^f
Sabin3F	Senso	AGG GCG CCC TAA CTT TG	53 pb	2537-2553 ^e
Q8	^a Anti-senso	ACY AAG AGG TCT CTA TTC CAC	1100 pb	3504-3483 ^g
Y7	Senso	TTT GTG TCA GCC TGT AAT GA	1100 pb	2402-2422 ^g
222	^a Anti-senso	CIC CIG GIG GIA YRW ACA T	356 pb	2969-2951 ^h
292	^a Senso	MIG CIG YIG ARA CNG G	356 pb	2612-2627 ^h

^a Iniciadores degenerados: p= (T+C); K=G/T; M=A/C; N= A/C/G/T; R= A/G; W=A/T; Y=C/T; I= Inosine (Código IUPAC de bases degeneradas).

^b Iniciadores utilizados na rotina de diagnóstico do LEV (dados não publicados)

^c Kilpatrick et al, 1996

^d Kilpatrick et al, 1998

^e Yang et al, 1991

^f Yang et al, 1992

^g Rico-Hesse et al, 1987

^h Orbeste et al, 2003

ⁱ Kilpatrick et al, 2009

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DAS METODOLOGIAS DE CONCENTRAÇÃO VIRAL

Para avaliação dos métodos de concentração, foi selecionada uma amostra para a realização de experimentos de recuperação de vírus utilizando-se os três métodos de concentração viral.

Nos experimentos onde foi inoculado PV1 Sabin, para cada método de concentração, duas garrafas apresentaram ECP característico de enterovírus, sendo uma na linhagem de células RD e outra na linhagem de L20B. Nestas garrafas, foi isolado PV1 Sabin, confirmado após testes moleculares.

Nos experimentos controle, apenas uma garrafa de cada método apresentou ECP característico de enterovírus na linhagem de células RD. Após os mesmos ensaios moleculares a que foram submetidos os isolados nos experimentos onde foi inoculado PV1 Sabin, concluiu-se que se tratava de um enterovírus não-pólio. Os isolados foram sequenciados para identificação e todos foram identificados como Coxsackievírus B4.

A **Tabela 1** mostra o resultado da recuperação de PV1 Sabin pelos três métodos de concentração viral utilizados, assim como o número de garrafas que apresentaram ECP e respectiva confirmação da recuperação de PV1 Sabin pelo método de RT-PCR.

Tabela 1 – Recuperação de PV1 Sabin utilizando diferentes metodologias de concentração viral.

	Nº de garrafas inoculadas em linhagens celulares		Nº de garrafas com ECP/ garrafas inoculadas		Confirmação por RT-PCR para PV1 Sabin	
	RD	L20B	RD	L20B	RD	L20B
Separação duas fases						
Inoculado PV1 Sabin (20 TCID ₅₀)	1	5	1/1	1/5	pos	pos
Controle	1	2	1/1*	0/2	neg	neg
Precipitação PEG						
Inoculado PV1 Sabin (20 TCID ₅₀)	1	5	1/1	1/5	pos	pos
Controle	1	2	1/1*	0/2	neg	neg
Adsorção sílica						
Inoculado PV1 Sabin (20 TCID ₅₀)	1	5	1/1	1/5	pos	pos
Controle	1	2	1/1*	0/2	neg	neg

Separação duas fases: método de separação em duas fases. Precipitação PEG: método de precipitação por PEG. Adsorção Sílica: método de adsorção por sílica. Nº - número. ECP - Efeito citopatogênico. PV1 Sabin - Poliovírus tipo 1 vacinal. Inoculado PV1 Sabin - amostra inoculada com o vírus-padrão PV1 Sabin. Controle - amostra não inoculada com o vírus-padrão PV1 Sabin. RD - Células de rdbomiosarcoma embrionário humano. L20B - Células L de camundongo geneticamente modificadas que expressam um receptor humano para poliovírus. Neg - negativo para PV1 Sabin. Pos - positivo para PV1 Sabin. RT-PCR para PV1 Sabin - Reação de Sorotipagem e de Sabin para confirmação de PV1 Sabin.

* Amostras com ECP nos experimentos controle - detectado CV-B4. CV- Coxsackievírus.

5.2 ANÁLISE DOS MÉTODOS NO CAMPO

Os métodos descritos foram utilizados para concentração de seis amostras obtidas de águas residuárias.

A **Tabela 2** apresenta os resultados dos vírus detectados, de acordo com os métodos de concentração viral utilizados. A eficiência dos métodos foi confirmada pelo isolamento viral nas linhagens celulares de RD e L20B.

Tabela 2 - Positividade por isolamento das amostras concentradas pelos três métodos de concentração testados simultaneamente.

Nº da Amostra	Separação em duas fases	Precipitação por PEG + NaCl	Adsorção por sílica
01 [*]	+	+	+
02	+	+	+
03	-	+	+
04	-	-	+
05	-	+	+
06	+	+	+

Nº - Número. (+) Vírus isolado. (-) Nenhum vírus isolado.

* Amostra utilizada para avaliação inicial dos métodos.

5.3 MONITORAMENTO DOS VÍRUS CIRCULANTES

Após avaliação no campo dos métodos de concentração viral, optou-se pela utilização dos métodos de precipitação por PEG e adsorção por sílica para o monitoramento realizado. Posteriormente, o método de adsorção por sílica foi eleito para dar continuidade ao monitoramento.

A **Tabela 3** apresenta os resultados obtidos pelo isolamento viral nas 31 amostras do estudo, de acordo com os métodos utilizados.

Tabela 3 - Detecção de enterovírus por método de concentração viral utilizado.

Métodos de concentração	Número de amostras positivas/ Número de amostras estudadas por método
Separação duas fases	3/6
Precipitação PEG e/ou Adsorção sílica	27/31

Separação duas fases: método de separação em duas fases. Precipitação PEG: método de precipitação por PEG. Adsorção Sílica: método de adsorção por sílica.

5.4 ISOLAMENTO VIRAL EM CULTURAS CELULARES

A **Tabela 4** apresenta os resultados do isolamento viral de acordo com as linhagens celulares utilizadas.

Tabela 4 - Isolamento viral em linhagens de células RD e L20B.

Linhagens de células	Número de amostras com isolamento viral (%)
RD	22/31 (70,9 %)
L20B	01/31 (3,2%)
RD + L20B	04/31 (12,9%)
Total	27/31 (87%)

RD - Células de rhabdomiosarcoma embrionário humano. L20B - Células L de camundongo geneticamente modificadas que expressam um receptor humano para poliovírus.

5.5 IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROVÍRUS DENTRE OS VÍRUS ISOLADOS

A reação de RT-PCR foi realizada para confirmar o resultado do isolamento viral com ECP característico de enterovírus, por meio da identificação dos vírus isolados como pertencentes ao gênero *Enterovirus*.

Todas as 27 amostras que apresentaram ECP característico de enterovírus foram positivas para enterovírus por RT-PCR. A **Figura 11** demonstra fragmentos amplificados de 153 pb, os quais representam o padrão da reação positiva para enterovírus.

Figura 11 - Perfil eletroforético dos produtos amplificados por RT-PCR em gel de poliacrilamida a 10% para a identificação do gênero *Enterovirus* (153 pb).

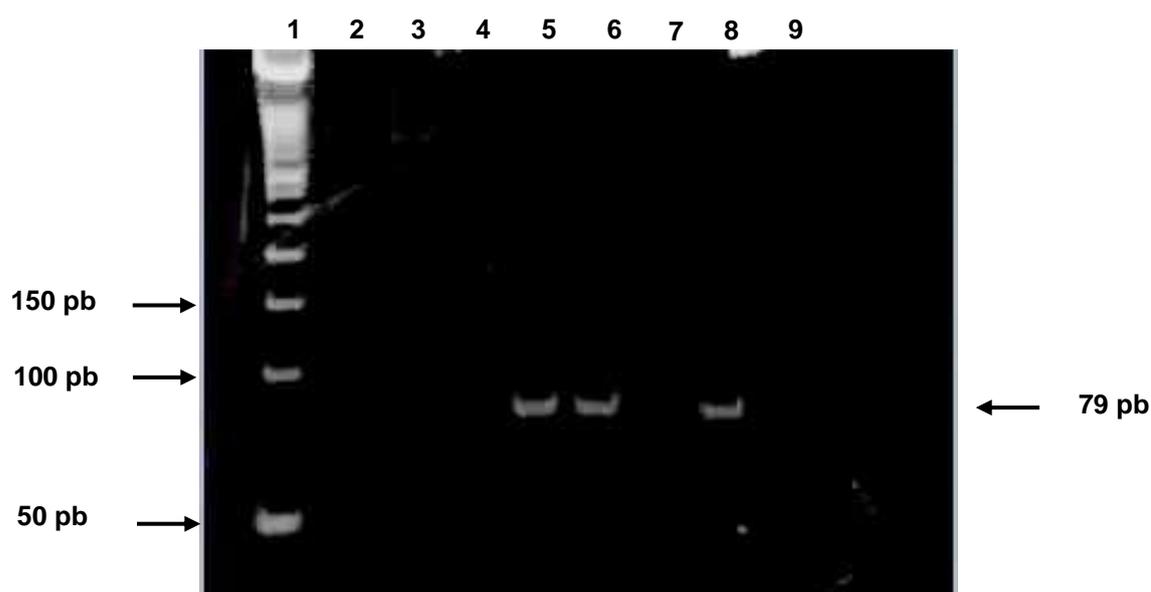


Poço 1 - Padrão de peso molecular de 50 pares de bases (pb). Poços 2 a 6 - Amostras positivas.
Poço 7 - Controle positivo (153 pb). Poço 8 - Controle negativo.

5.6 IDENTIFICAÇÃO DOS POLIOVÍRUS DENTRE OS ENTEROVÍRUS ISOLADOS

As 27 amostras positivas para enterovírus foram submetidas a uma nova reação de RT-PCR para identificação de poliovírus dentre os isolados. Oito (29,6%) amostras foram positivas nesta reação. Fragmentos de 79 pb foram observados nas amostras confirmando como sendo positivas para poliovírus. O perfil eletroforético dos produtos amplificados está ilustrado na **Figura 12**.

Figura 12 - Perfil eletroforético dos produtos amplificados por RT-PCR em gel de poliacrilamida a 10% para identificação de poliovírus (79 pb).



Poço 1 - Padrão de peso molecular de 50 pares de bases (pb).

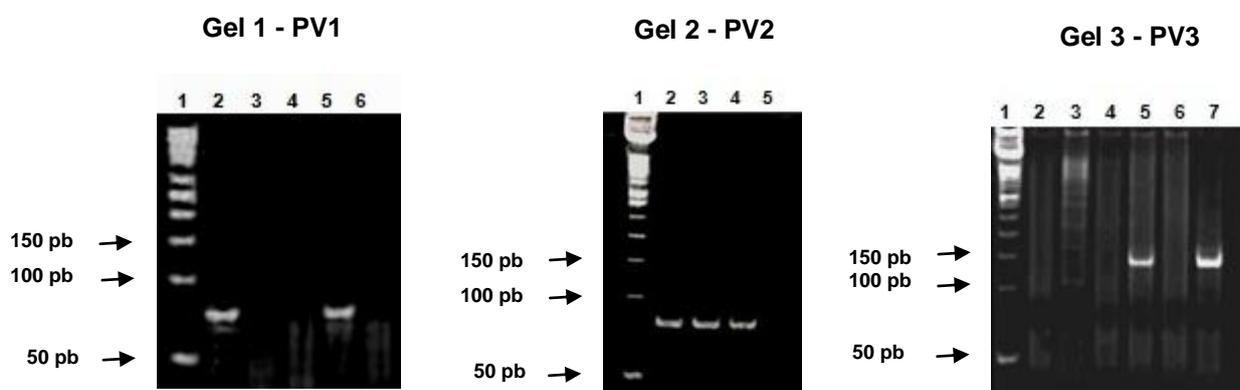
Poços 2, 3 e 4 - Amostras negativas. Poços 5 e 6 - Amostras positivas. Poço 7 - Amostra negativa. Poço 8 - Controle positivo (79 pb). Poço 9 - Controle negativo.

5.7 CARACTERIZAÇÃO INTRATÍPICA DOS SOROTIPOS DE POLIOVÍRUS

As oito amostras positivas para poliovírus foram submetidas a duas novas reações de RT-PCR para identificação dos sorotipos e caracterização intratípica.

O sorotipo 1 foi isolado em uma amostra; o sorotipo 2, em cinco amostras e o sorotipo 3 em duas amostras. Todas as cepas isoladas foram identificadas como vacinais ou *Sabin like*. Fragmentos de 70, 79 e 140 pb nos produtos amplificados foram esperados para os sorotipos 1, 2 e 3, respectivamente. Os perfis eletroforéticos dos produtos amplificados são mostrados na **Figura 13**.

Figura 13 - Perfis eletroforéticos dos produtos amplificados por RT-PCR em gel de poliacrilamida a 10% para identificação do Sorotipo 1 (70 pb); Sorotipo 2 (79 pb) e Sorotipo 3 (140 pb) de poliovírus.



PV1 - sorotipo 1. PV2 - sorotipo 2. PV3 - sorotipo 3.

Gel 1 - Reação RT- PCR PV1. Poço 1 - Padrão de peso molecular de 50 pares de bases (pb).

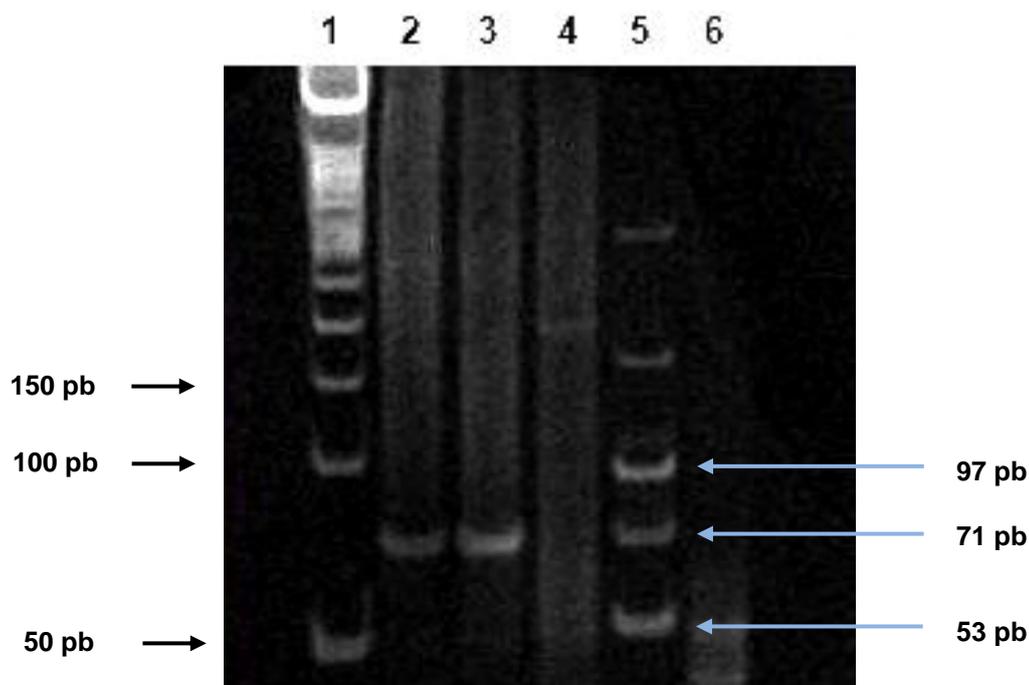
Poço 2 - Amostra positiva (sorotipo 1). Poços 3 e 4 - Amostras negativas. Poço 5 - Controle positivo (70 pb). Poço 6 - Controle negativo.

Gel 2 - Reação RT- PCR PV2. Poço 1 - Padrão de peso molecular de 50 pares de bases. Poços 2 e 3 - Amostras positivas (sorotipo 2). Poço 4 - Controle positivo (79 pb). Poço 5 - Controle negativo.

Gel 3 - Reação RT- PCR PV3. Poço 1 - Padrão de peso molecular de 50 pares de bases. Poços 2, 3 e 4 - Amostras negativas. Poço 5 - Amostra positiva (sorotipo 3). Poço 6 - Controle negativo. Poço 7 - Controle positivo (140 pb).

A reação de RT-PCR Sabin foi realizada para caracterização intratípica (vacinal ou selvagem). Fragmentos de 97, 71 e 53 pb foram observados nos produtos amplificados confirmando os isolados como vacinais ou *Sabin like* (Sabin 1, Sabin 2 e Sabin 3, respectivamente). O perfil eletroforético dos produtos amplificados está ilustrado na **Figura 14**.

Figura 14 - Perfis eletroforéticos dos produtos amplificados por RT-PCR em gel de poliacrilamida a 10% para caracterização intratípica dos poliovírus: Sabin 1 (97 pb); Sabin 2 (71 pb) e Sabin 3 (53 pb).



Poço 1 - Padrão de peso molecular de 50 pares de bases (pb). Poço 2 e 3 - Amostras positivas (Sabin 2). Poços 4 - Amostra negativa. Poço 5 - Controles positivos (Sabin 1 - 97 pb; Sabin 2 - 71 bp e Sabin 3 - 53 pb). Poço 6 - Controle negativo.

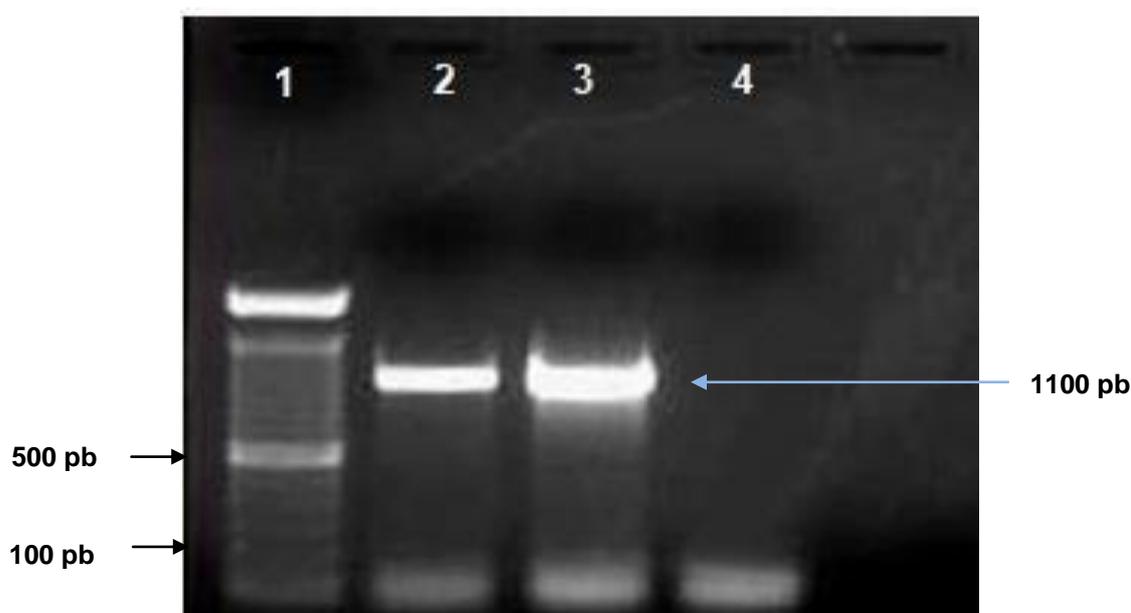
5.8 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS POLIOVÍRUS E ENTEROVÍRUS NÃO- PÓLIO CIRCULANTES

5.8.1 Caracterização dos poliovírus por sequenciamento completo do gene VP1

Para caracterização molecular dos poliovírus isolados e análise da sua estabilidade frente às cepas vacinais de referência PV1 Sabin, PV2 Sabin e PV3 Sabin, foi realizado sequenciamento nucleotídico completo do gene VP1.

Os produtos amplificados pela reação de PCR (**Figura 15**) foram purificados, quantificados e submetidos a reações de *Cycle Sequencing*.

Figura 15 - Perfil eletroforético dos produtos amplificados por PCR em gel de agarose a 1%, para caracterização molecular dos poliovírus (1100 pb).



Poço 1 - Marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) (*DNA Ladder*).
Poço 2 - Amostra positiva. Poço 3 - Controle positivo (1100 pb).
Poço 4 - Controle negativo.

Após a análise das sequências e comparação com sequências de cepas de referência Sabin depositadas no *GenBank*, as amostras foram caracterizadas e analisadas quanto a sua estabilidade frente às cepas de referência.

As sequências completas de nucleotídeos que codificam a principal proteína de capsídeo viral, VP1 (poliovírus 1 = 906 nt; poliovírus 2 = 903 nt e poliovírus 3 = 900 nt), das oito amostras de poliovírus isolados foram comparadas às cepas de referência vacinal.

Todas as sequências nucleotídicas foram traduzidas em aminoácidos pelo programa *BioEdit*, com o objetivo de identificar se as diferenças nucleotídicas resultariam em alterações nas sequências proteicas codificadas.

A análise das sequências mostrou que todas as cepas não continham mutações suficientes para serem classificadas como cPVDV ou cepas selvagens, sendo, portanto, todas consideradas como vacinais ou *Sabin-like*.

A **Tabela 5** apresenta as mutações nucleotídicas presentes no gene da proteína VP1 nos poliovírus isolados, quando comparadas às cepas de referências vacinais para os três sorotipos (Sabin 1 [número de acesso AY1842219]; Sabin 2 [número de acesso AY184220] e Sabin 3 [número de acesso AY1842221]).

Tabela 5 - Mutações nucleotídicas e substituições de aminoácidos identificados no gene VP1 dos poliovírus isolados em relação à cepa vacinal padrão.

Nº da Amostra	Sorotipo isolado	Nº de mutações na VP1	Nucleotídeo		Aminoácido	
			Tipo de substituição	Posição da mutação no genoma ^a	Posição do AA na VP1	Alteração de AA
05	PV2 <i>Sabin like</i>	01	NS	A2626G	49	T → A
06	PV2 <i>Sabin like</i>	02	NS	T2548C	23	S → P
			NS	T2909C	143	I → T
11	PV2 <i>Sabin like</i>	01	NS	T2909C	143	I → T
12	PV2 <i>Sabin like</i>	01	NS	T2909A	143	I → N
13	PV3 <i>Sabin like</i>	05	NS	C2493T	6	T → I
			S	C2683T	69	---
			S	A2698G	74	---
			S	A2821G	115	---
			NS	C2967T	164	T → I
15	PV1 <i>Sabin like</i>	02	NS	A2774G	295	K → E
			NS	A3059T	194	I → F
16	PV2 <i>Sabin like</i>	02	NS	T2909A	143	I → N
			S	A3363G	294	---
23	PV3 <i>Sabin like</i>	03	NS	C2493T	6	T → I
			S	C2683T	69	---
			S	A2869G	131	---

Nº - número. AA - aminoácido. VP1 - gene que codifica a proteína VP1 do genoma viral. PV1 *Sabin like* - Poliovírus sorotipo 1 vacinal. PV2 *Sabin like* - Poliovírus sorotipo 2 vacinal. PV3 *Sabin like* - Poliovírus sorotipo 3 vacinal. S - mutação sinônima. NS - mutação não-sinônima. (---) - Sem alteração de AA. A - Alanina. E - Ácido glutâmico. F - Fenilalanina. I - Isoleucina. K - Lisina. N - Asparagina. P - Prolina. S - Serina. T - Treonina.

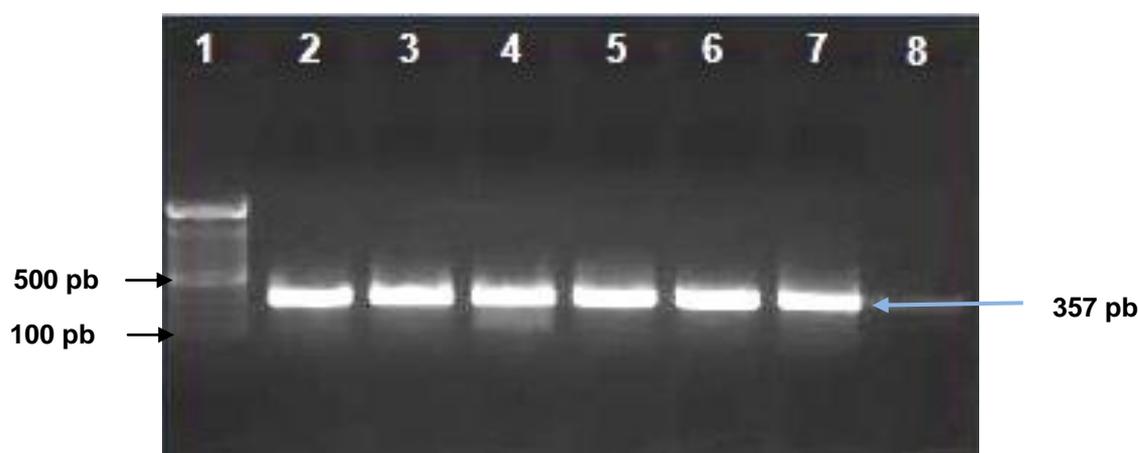
^a O primeiro nucleotídeo refere-se ao presente na cepa-padrão *Sabin*. O segundo nucleotídeo refere-se ao substituído presente na amostra.

5.8.2 Caracterização dos enterovírus não-pólio por sequenciamento parcial do gene VP1

Para a caracterização dos enterovírus não-pólio isolados, foram realizadas reações de sequenciamento parcial do gene VP1 com todas as amostras positivas para enterovírus e negativas para poliovírus pelas reações de RT-PCR PAN-EV e RT-PCR PAN-PV, respectivamente.

Os produtos amplificados pela reação de PCR (**Figura 16**) foram purificados, quantificados e submetidos a reações de *Cycle-Sequencing*.

Figura 16 - Perfil eletroforético dos produtos amplificados por PCR em gel de agarose a 1%, para identificação dos enterovírus não-pólio (357 pb).



Poço 1 - Marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) (*DNA Ladder*).

Poços 2 a 6 - Amostras positivas. Poço 7 - Controle positivo (357 pb).

Poço 8 - Controle negativo.

Após a análise das sequências e comparação com outras sequências depositadas no *GenBank* utilizando o programa *Blast*, as amostras foram identificadas e tiveram seus sorotipos determinados (item 5.9).

5.9 CARACTERIZAÇÃO DOS VÍRUS ISOLADOS

A frequência de isolamento dos enterovírus neste estudo foi de 87% (27/31). Em uma mesma amostra foi possível identificar enterovírus de um mesmo ou diferentes sorotipos, totalizando 35 detecções em 27 amostras positivas.

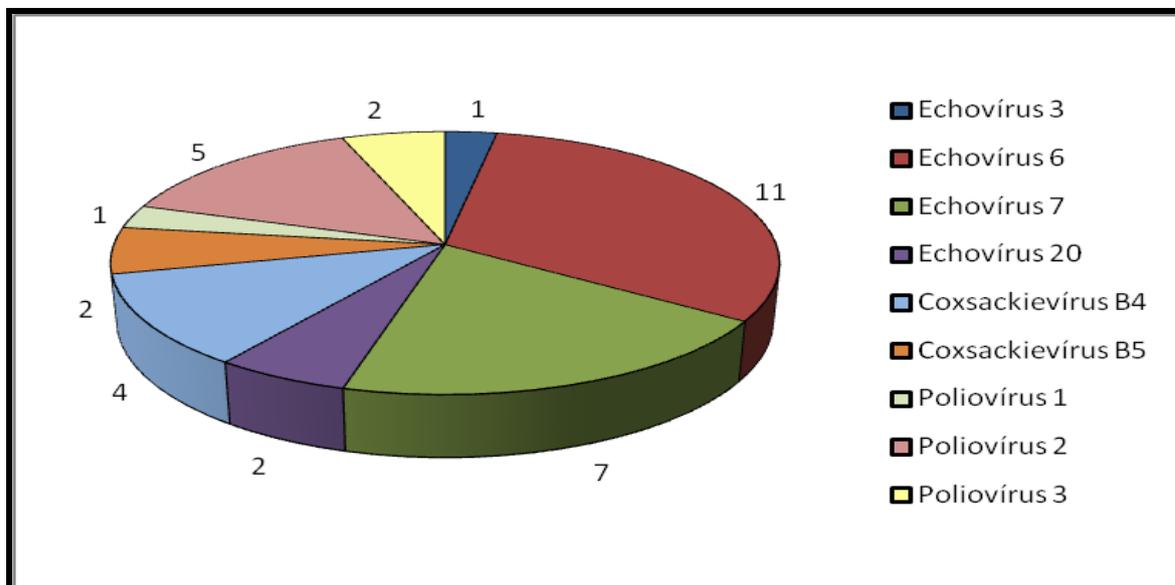
A espécie mais frequente foi *Enterovirus B* com 27 detecções, seguida da espécie *Enterovirus C* com 8 detecções.

A espécie *Enterovirus B* compreendeu os seguintes sorotipos virais: Echovírus 3 (E-3) identificado em uma das 27 amostras (3,7%); Echovírus 6 (E-6) em 11/27 (40,7%); Echovírus 7 (E-7) em 7/27 (25,9%); Echovírus 20 (E-20) em 2/27 (7,4%); Coxsackievírus B4 (CVB4) em 4/27 (14,8%) e Coxsackievírus B5 (CVB5) em 2/27(7,4%).

A espécie *Enterovirus C* compreendeu os seguintes sorotipos virais: Poliovírus tipo 1 (PV1) em uma das 27 amostras (3,7%); Poliovírus tipo 2 (PV2) em 5/27 (18,5%) e Poliovírus tipo 3 (PV3) em 2/27 (7,4%).

A **Figura 17** ilustra a diversidade dos sorotipos de enterovírus identificados em relação ao número total de detecções a partir das águas residuárias coletadas na ETE Alegria/Cedae no período do estudo.

Figura 17 - Frequência absoluta do número de enterovírus isolados em relação ao número total de detecções.



Nove sorotipos de enterovírus foram identificados. O número representa as detecções por sorotipo.

Nas 27 amostras positivas, houve detecção de um ou mais sorotipos de enterovírus.

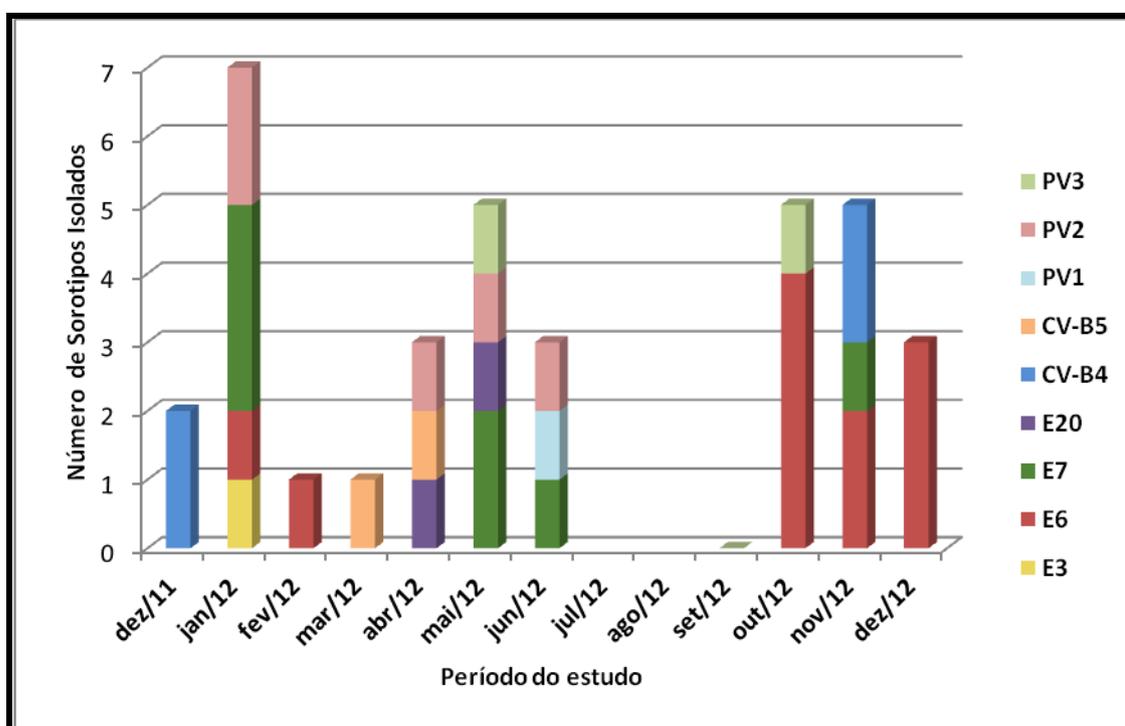
Poliovírus foram isolados em oito amostras, sendo o sorotipo 1 detectado no mês de junho/2012; o sorotipo 2 no meses de janeiro, abril, maio e junho/2012 e o sorotipo 3 nos meses de maio e outubro/2012. Em seis amostras positivas para poliovírus, detectou-se também enterovírus não-pólio, como E-3, E-6 e E-20, nos meses de janeiro, abril, maio e início de junho/2012. Nas duas amostras restantes, foi isolado somente poliovírus, sendo o sorotipo 2 isolado no mês de junho e o sorotipo 3 no mês de outubro/2012 (**Tabela 6**).

Os enterovírus não-pólio foram isolados em 25 amostras. Em algumas amostras, foram detectados dois ou mais sorotipos de enterovírus. No mês de dezembro/2011 foi isolado somente CV-B4. No mês de janeiro/2012, foram isolados E-3, E-6 e E-7. Em fevereiro, somente E-6 e em março, somente CV-B5. No mês de abril, houve detecção de E-20 e CV-B5. Em maio, foram isolados E-7 e E-20. No mês de junho, houve isolamento de E-7. Nos meses de julho e agosto/2012 não houve coleta. As amostras coletadas no mês de setembro não

apresentaram ECP no isolamento em linhagens celulares, tendo o resultado negativo confirmado por RT-PCR para enterovírus. No mês de outubro, foi isolado E-6. No mês de novembro, E-6, E-7 e CV-B4. No mês de dezembro/2012, foi isolado somente E-6.

A **Figura 18** mostra a distribuição mensal dos sorotipos de poliovírus e enterovírus não-pólio isolados durante o período de estudo.

Figura 18 - Distribuição mensal dos sorotipos de PV e EVNP no período de dezembro/2011 a junho/2012 e setembro/2012 a dezembro/2012.



PV - Poliovírus. EVNP - Enterovírus não-pólio. CV- Coxsackievírus. E - Echovírus.

A **Tabela 6** apresenta o resultado consolidado dos enterovírus caracterizados no estudo. Observou-se a co-deteção de mais de um sorotipo em uma mesma amostra, totalizando 35 detecções em 27 amostras positivas para enterovírus. Estão destacadas as amostras em que foram isolados poliovírus.

Tabela 6 - Sorotipos isolados de PV e EVNP por amostra no período do estudo.

Mês da coleta	Nº Amostra	Sorotipo de EV detectado	Mês da coleta	Nº Amostra	Sorotipo de EV detectado
Dez/2011	1	CV-B4	Set/2012	17	Neg
Dez/2011	2	CV-B4	Set/2012	18	Neg
Jan/2012	3	E-7	Out/2012	19	E-6
Jan/2012	4	E-7	Out/2012	20	E-6
Jan/2012	5	E-3 + PV2 <i>Sabin like</i>	Out/2012	21	E-6
Jan/2012	6	E-6 + E-7 + PV2 <i>Sabin like</i>	Out/2012	22	E-6
Fev/2012	7	Neg	Out/2012	23	PV3 <i>Sabin like</i>
Fev/2012	8	E-6	Nov/2012	24	E-6 + E-7
Mar/2012	9	CV-B5	Nov/2012	25	E-6
Abr/2012	10	CV-B5	Nov/2012	26	CV-B4
Abr/2012	11	E-20 + PV2 <i>Sabin like</i>	Nov/2012	27	CV-B4
Mai/2012	12	E-7 + PV2 <i>Sabin like</i>	Dez/2012	28	E-6
Mai/2012	13	E-7 + PV3 <i>Sabin like</i>	Dez/2012	29	E-6
Mai/2012	14	E-20	Dez/2012	30	E-6
Jun/2012	15	E-7 + PV1 <i>Sabin like</i>	Dez/2012	31	Neg
Jun/2012	16	PV2 <i>Sabin like</i>			

Nº - Número. PV - Poliovírus. EV - Enterovírus. EVNP - Enterovírus não-pólio. CV -Coxsackievírus. E - Echovírus. PV1 *Sabin like* - Poliovírus tipo 1 vacinal. PV2 *Sabin like* - Poliovírus tipo 2 vacinal. PV3 *Sabin like* - Poliovírus tipo 3 vacinal. Neg - resultado negativo. Total de amostras positivas para enterovírus - 27 amostras. Total de detecções - 35 enterovírus detectados em 27 amostras positivas. Destaque em vermelho – amostras positivas para poliovírus.

6. DISCUSSÃO

As intensas campanhas de imunização realizadas dentro do contexto da erradicação global da poliomielite levaram a uma redução acentuada da circulação de poliovírus selvagens. Todavia, os poliovírus selvagens ainda permanecem endêmicos em três países (Afeganistão, Paquistão e Nigéria) e casos de re-emergência por importação destes vírus foram relatados, em anos anteriores, em países antes considerados livres da circulação das cepas selvagens. Até maio de 2013, seis casos de importação de poliovírus selvagens foram relatados (Somália= 4 casos; Quênia= 2 casos) (GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2013a).

Como já mencionado, a utilização em larga escala da VOP pode, em algumas situações, propiciar o surgimento de cepas de PVDVs responsáveis por surtos de poliomielite paralítica, o que já ocorreu em diferentes partes do mundo. Até maio de 2013, nove casos de circulação de cPVDV foram relatados (HOVI, 2012; GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2013c).

Enquanto a erradicação não for alcançada, a circulação de cepas selvagens e de PVDVs, com risco potencial de recuperação da capacidade de neurovirulência, continuará representando um desafio para o alcance da erradicação global da doença (KEW et al, 2005; MINOR, 2009; ROIVANEM et al, 2010).

A vigilância ambiental dos poliovírus representa o monitoramento da transmissão desses vírus (selvagens, vacinais e PVDVs) na população por meio da análise de amostras supostamente contaminadas com fezes humanas. Baseia-se no fato de que indivíduos infectados por poliovírus, sintomáticos ou não, podem excretar grandes quantidades de partículas virais por várias semanas no ambiente. Este monitoramento já é realizado em diversos países e tem sido capaz de detectar poliovírus selvagens e PVDVs, mesmo na ausência de casos relatados de PFAs, (WHO, 2003; HOVI, 2012).

Como dito anteriormente, o Brasil apresenta altos índices de cobertura vacinal (média nacional > de 95%) (BRASIL, 2012a). Todavia, por não ocorrer de forma homogênea em todo o território nacional, apresenta algumas regiões com índices abaixo da média desejada (<95%): Alagoas (90,22%); Amazonas (91,93%); Amapá (92,67%); Bahia (93,26%); Distrito Federal (93,65%); Paraíba (92,08%);

Piauí (93,91%); Rio Grande do Norte (93,98%); Rio Grande do Sul (89,40%); Roraima (88,78%) e Tocantins (92,75%) (Programa Nacional de Imunizações (PNI), 2013). Isso possibilita a existência de bolsões de indivíduos suscetíveis, o que pode favorecer o surgimento e a circulação de PVDVs, assim como a reintrodução de poliovírus selvagens importados de países endêmicos (GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2013a).

Com o crescente volume de viagens e comércio internacionais, diversos microrganismos patogênicos podem facilmente se dispersar entre os continentes (NASH et al, 2001). A não ocorrência de poliomielite por poliovírus selvagens no país não é suficiente para afastar seu risco, uma vez que os vírus ainda circulam em outros países e podem ser reintroduzidos por viajantes infectados em regiões que apresentam bolsões de indivíduos suscetíveis (BRASIL, 2012c). O Brasil mantém relações bilaterais políticas, comerciais (MINISTÉRIO DAS RELAÇÕES EXTERIORES) e de transporte frequentes com países que reintroduziram o poliovírus selvagem (China, Congo, Costa do Marfim, Gabão, Guiné, Quênia, Libéria, Mali, Níger) (GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2013a).

Diferentes metodologias vêm sendo utilizadas para a concentração viral em amostras de águas residuárias, baseando-se nas características físico-químicas das partículas virais (ENGLAND, 1977; TSAI et al, 1993; SHIEH et al, 1995; VANTARAKIS; PAPAPETROPOULOU, 1999; CETESB, 2001; KATAYAMA; SHIMASAKI; OHGAKI, 2002; ALBERTSSON, 1971; SHIEH et al, 1995; LEISINGER, 1997; BAGGI, 2001; van HEERDEN, 2005 apud ZURBRIGGEN et al, 2008).

Alguns métodos baseiam-se na capacidade de adsorção dos vírus a matrizes carregadas positiva ou negativamente (membranas, fibras de vidro, de pó ou de algodão), seguidas de uma etapa de eluição química. A concentração viral também pode ser baseada no fato dos vírus de apresentarem uma massa molecular relativamente alta, o que possibilita concentrá-los através de métodos de ultracentrifugação, ultrafiltração (MEHNERT; STEWIEN, 1993; WYN-JONES; SELLWOOD, 2001; FONG; LIPP, 2005; GARCÍA, 2006 apud GUIMARÃES, 2007) ou hidroextração com PEG (SHIEH et al, 1995).

Um bom método de concentração deve ser tecnicamente simples, rápido e acessível e capaz de, a partir de volumes maiores de água, obter um pequeno

volume de concentrado, de promover uma grande recuperação de vírus e de detectar uma ampla variedade de vírus, além de ser repetitivo e reprodutível (BOSCH, 1998; LI et al, 1998; WYN-JONES; SELLWOOD, 2001 apud TAVARES; CARDOSO; BRITO, 2005).

O método de separação em duas fases baseia-se na formação de duas fases aquosas o que permite a concentração e extração de partículas virais. A formação em duas fases se dá em função da incompatibilidade, em solução, dos polímeros hidrofílicos PEG e dextrana, permitindo a preservação da estabilidade molecular dos vírus e a sua purificação (ALBERTSON, 1967 apud WHO, 2003; ALBERTSSON, 1971; CABEZAS, 1996 apud PADILHA et al, 2011). No método de precipitação por PEG, as partículas virais são precipitadas e concentradas por ação do polímero PEG e de um sal (SHIEH et al, 1995). Já o método de adsorção por sílica baseia-se na concentração das partículas virais a partir da floculação por cloreto de alumínio, seguida de adsorção a partículas de dióxido de silício (ZURBRIGGEN et al, 2008).

Todos os métodos foram previamente avaliados quanto à eficiência na recuperação de poliovírus e seus resultados analisados, de acordo com as recomendações constantes no manual da OMS (WHO, 2003).

Nos experimentos com o inoculado PV1 Sabin de cada método de concentração, duas garrafas que apresentaram ECP revelaram o isolamento de PV1 Sabin, mostrando que houve recuperação do vírus inoculado. Nos experimentos controle, a única garrafa que apresentou ECP não revelou o isolamento de PV1 Sabin, conforme esperado. Nestas, foi isolado Coxsackievírus B4. Não foram realizados ensaios quantitativos que possibilitassem quantificar o vírus PV1 Sabin recuperado. A recuperação do vírus foi confirmada apenas com a análise qualitativa pelo ensaio de RT-PCR, conforme mencionado anteriormente. Após análise dos resultados, os três métodos foram considerados adequados para serem utilizados com as demais amostras do estudo.

Inicialmente o método de separação em duas fases preconizado pelo manual da OMS (WHO, 2003) seria utilizado para concentrar todas as amostras do estudo. Entretanto, como já mencionado anteriormente, em função do alto custo de um dos polímeros, optou-se por outros métodos que atendessem a necessidade do

estudo e que apresentassem boa eficiência e baixo custo. Foram utilizados, portanto, os métodos de precipitação com PEG e adsorção por sílica.

Observou-se uma maior detecção de enterovírus nas amostras processadas pelos métodos de precipitação por PEG e de adsorção por sílica do que naquelas processadas pelo método de separação em duas fases. O método de separação em duas fases, além de apresentar um alto custo, é trabalhoso, demorado e requer alguns cuidados nas diferentes etapas do procedimento. Acredita-se que esses motivos possam ter influenciado na menor detecção de vírus por este método comparado aos demais. Contudo, não se pode afirmar que esse método não seja eficiente em relação aos demais, considerando que não foram realizados testes quantitativos para avaliar a taxa de recuperação dos vírus nas amostras submetidas à concentração por cada método. Observou-se, no entanto, que as amostras processadas pelo método de sílica, apresentavam ECP nas linhagens RD e L20B mais rapidamente que aquelas processadas pelos demais métodos (dados não mostrados). Em um estudo realizado na Finlândia, o método de separação em duas fases mostrou-se mais eficiente que o método de precipitação por PEG (HOVI et al, 2001). ZURBRIGGEN e colaboradores (2008) obtiveram pelo método de sílica uma taxa de recuperação viral 60% superior àquela obtida pelo método de separação em duas fases, recomendado pela OMS.

As culturas de células recomendadas pela OMS para o isolamento de poliovírus e enterovirus não-pólio, a partir de amostras ambientais, são as linhagens L20B e RD. A linhagem RD é suscetível aos enterovirus humanos, enquanto que, a linhagem L20B expressa receptores específicos para poliovírus, sendo específica, portanto, para o isolamento desses agentes. O uso da linhagem L20B é de extrema importância na análise de amostras onde enterovírus não-pólio poderiam mascarar a presença de poliovírus (WHO, 2003). DESHPANDE e colaboradores (2003) demonstraram, em um estudo realizado na Índia, que o uso da linhagem L20B é eficiente na seleção de poliovírus na presença de enterovírus não-pólio, quando a quantidade desses últimos excede em 1000 vezes a de poliovírus. Além disso, que poliovírus selvagens podem ser detectados mesmo na presença de cepas vacinais circulantes no ambiente.

No presente estudo, a taxa de isolamento viral nas linhagens de células RD e L20B foi de 87% (27/31). Em 22 amostras, foi observado ECP característico de

enterovírus somente na linhagem RD; em uma amostra, somente em L20B e em quatro amostras, em RD e L20B, simultaneamente. Todos os enterovírus não-pólio foram isolados somente em RD. Os poliovírus foram isolados nas linhagens RD e L20B (RD= 3 isolados; L20B= 1 isolado e RD/L20B= 4 isolados). A linhagem L20B isolou somente poliovírus. A taxa de isolamento viral deste estudo está de acordo com um estudo realizado por VINJÉ e colaboradores (2004) que relatou 85%.

A detecção de enterovírus não-pólio nas amostras coletadas é um indicativo de que a vigilância ambiental está sendo realizada de forma satisfatória (OMS, 2003). Espera-se encontrar, pelo menos, 30% de enterovírus não-pólio em amostras processadas pelo método *Grab*. Em populações imunizadas com VOP, espera-se encontrar poliovírus *Sabin like*, especialmente durante e após as campanhas nacionais de imunização (OMS, 2003).

Poliovírus, assim como outros enterovírus, são conhecidos por serem capazes de manter sua infecciosidade por alguns meses em águas naturais (POYRY; STENVIK; HOVI, 1988; YANG et al, 1991; CHOWDHARY; DHOLE, 2008).

Estudos mostram que, grupos de indivíduos vulneráveis como imunodeficientes vacinados com VOP podem contribuir para a circulação de poliovírus no ambiente por longos períodos (KEW et al, 2005; KHETSUARIANI et al, 2010; LODDER et al, 2012). A caracterização de um poliovírus como PVDV é fornecida pelo número de mutações identificadas a partir da comparação com cepas vacinais de referência (KEW et al, 2005).

Como já mencionado, classifica-se os sorotipos 1 e 3 como PVDVs pela presença de 1% ou mais de divergência na sequência de nucleotídeos do gene VP1 (906 nt para PV1, 903 nt para PV2 e 900 nt para os PV3) em comparação às cepas de referência. A presença de 10 mutações e de 9 mutações para os sorotipos 1 e 3, respectivamente, classificaria os isolados como PVDVs, enquanto que, diferenças de seis ou mais nucleotídeos (0,6%) classifica o sorotipo 2 como um PVDV. A presença de 6 mutações classificaria os PV2 isolados como PVDVs. Poliovírus com menos de 1% de divergência, são considerados “*Sabin-like*” (BLOMQUIST et al, 2012). Essa demarcação de 1% de diferença na sequência nucleotídica de VP1 indica que a replicação do vírus vacinal tenha ocorrido há aproximadamente um ano (KEW et al, 2005).

Todas as cepas de poliovírus isoladas neste estudo mostraram diferenças nucleotídicas em relação às cepas-padrão vacinais. Foram observadas mutações sinônimas e não-sinônimas nos isolados. Um estudo realizado no LEV analisou amostras de poliovírus isolados de amostras de águas residuárias, coletadas no estado de São Paulo. Alguns isolados demonstraram possuir mutações importantes para a neurovirulência. Não foram detectados PVDVs dentre os isolados (GREGIO, 2006).

A evolução molecular dos poliovírus é caracterizada pela propagação seletiva dos variantes virais gerados a partir de mutações e recombinações heterotípicas ou intragênicas (KEW et al, 2005). A presença de mutações não-sinônimas e recombinações caracteriza que a evolução da cepa Sabin ocorreu durante a replicação viral no intestino dos recipientes da vacina e de seus contactantes suscetíveis (KEW et al, 1998; ZURBRIGGEN et al, 2008). Algumas dessas mutações são conhecidas por contribuírem para o aumento da eficiência na replicação viral e para a reversão ao fenótipo neurovirulento com aumento da possibilidade de causar doença neurológica (ZURBRIGGEN et al, 2008).

O número de mutações sinônimas dentro da região do gene VP1 é usado para estimar a “idade” da cepa de poliovírus, ou seja, o tempo de replicação *in vivo* em um único ou vários indivíduos (HOVI et al, 2004; ZURBRIGGEN, 2008). A ausência de mutações sinônimas indica que a cepa é “recém-nascida”, ou seja, que a substituição nucleotídica ocorreu durante a replicação do vírus no próprio recipiente da vacina ou seu contactante. A presença de uma a 10 mutações sinônimas indica que a cepa é “jovem”, ou seja, as mutações ocorreram há menos de um ano (YAKOVENKO et al, 2006).

Dentre as mutações observadas no gene VP1, algumas não-sinônimas podem afetar resíduos de aminoácidos em códons conhecidos por implicarem no fenótipo atenuado das cepas-padrão utilizadas na VOP (marcadores de atenuação): Resíduos A⁸⁸, T¹⁰⁶ e F¹³⁴ no sorotipo Sabin 1 (ROUCHARD; LAM; RACANIELLO, 1995); resíduo I¹⁴³ no sorotipo Sabin 2 (MACADAM et al, 1993) e resíduo T⁶ no sorotipo Sabin 3 (WEEKS-LEVY et al, 1991; TATEM et al, 1992). Muitas mutações levam à substituição do aminoácido I → T; entretanto, várias substituições I → V, I → S e I → N têm sido observadas (MUELLER et al, 2009).

As duas mutações não-sinônimas (K^{295} e I^{194}) observadas no isolado do sorotipo 1 não estão localizadas em aminoácidos considerados marcadores de atenuação. Entretanto, os isolados dos sorotipos 2 e 3 apresentaram sinais de diminuição na atenuação. Quatro dos cinco isolados do sorotipo 2 revelaram mutações não-sinônimas no aminoácido I^{143} ($I \rightarrow T$) e ($I \rightarrow N$), indicando instabilidade genética neste sorotipo, em concordância com os dados relatados por MACADAM et al (1993) e por MUELLER e colaboradores (2009). Os isolados do sorotipo 3 apresentaram mutações não-sinônimas no aminoácido T^6 ($T \rightarrow I$), em concordância com os resultados de MUELLER et al (2009) e de GREGIO (2006). Os nossos resultados estão em concordância com um estudo realizado no LEV, a partir de amostras clínicas, que detectou a presença de mutações no aminoácido I^{143} ($I \rightarrow T$) do sorotipo 2 e no aminoácido T^6 ($T \rightarrow I$) do sorotipo 3 (COSTA, 2011). Pode-se deduzir que estas mutações são comuns nos poliovírus circulantes, visto que também foram detectadas em poliovírus isolados de casos clínicos e podem representar um risco para indivíduos suscetíveis por ocorrerem em aminoácidos específicos relacionados à perda do fenótipo atenuado.

A amostra **16** (sorotipo 2), coletada na semana posterior à campanha nacional de imunização ocorrida em 18 de junho de 2012, apresentou uma pequena divergência genética em relação à cepa Sabin de referência (mutação sinônima = 1; não-sinônima=1). Observou-se uma mutação não-sinônima no aminoácido I^{143} ($I \rightarrow T$). Esta pequena divergência é concordante com os resultados encontrados em outros estudos, mostrando que a excreção de poliovírus, após a imunização com VOP, ocorre por algumas semanas, sugerindo que uma excreção prolongada ocorra exclusivamente por crianças vacinadas recentemente (CUERVO et al, 2001; MUELLER et al, 2009). Sugere-se, portanto, que a mutação do aminoácido I^{143} presente nesta amostra tenha surgido nas primeiras fases de replicação viral nos recipientes da vacina (ZURBRIGGEN et al, 2008).

Observou-se que o sorotipo 1 de poliovírus foi menos frequente (12,5% - 01/08) que os sorotipos 2 (62,5% - 05/08) e 3 (25% - 02/08). Os resultados estão concordantes com os dados relatados, na Nova Zelândia, por HUANG et al (2005) e, em Córdoba, Argentina (MUELLER et al, 2009). Acredita-se que esta diferença possa estar associada à quantidade de partículas virais excretadas; à duração da

excreção; à estabilidade do vírus no ambiente ou na capacidade de ser transmitido de indivíduos recipientes da vacina a seus contactantes (MUELLER et al, 2009). No Brasil, SCHLINDWEIN (2009) detectou PV em 67% das amostras analisadas de lodo de esgoto.

Um estudo de vigilância ambiental realizado por ROIVAINEN et al (2010) mostrou que cepas de PVDVs com a capacidade de neurovirulência recuperada foram repetidamente detectadas no esgoto na Finlândia. Embora nenhum caso de poliomielite suspeita tenha sido relatado no país desde 1985, os autores do estudo enfatizaram a importância da manutenção das altas taxas de cobertura vacinal e da vigilância ambiental (ROIVANEN et al, 2010).

Regiões com índices de cobertura vacinal abaixo do desejado e/ou com cobertura não realizada de forma homogênea podem apresentar grupos de indivíduos suscetíveis a infecções por PVDVs e poliovírus selvagens, favorecendo a emergência de surtos na população (BLOMQVIST et al, 2012; LODDER et al, 2012).

Enterovírus não-pólio são endêmicos no mundo inteiro e múltiplas infecções com vários sorotipos têm sido relatadas. O monitoramento da circulação de enterovírus tem sido útil no estabelecimento de padrões temporais e geográficos de circulação de cada sorotipo e na caracterização dos sorotipos predominantes em casos de surtos e na determinação das relações filogenéticas entre as cepas (KARGAR, SADEGHIPOUR; NATEGH, 2009; KHETSUARIANI et al, 2010).

A alta taxa de detecção de enterovírus não-pólio em amostras ambientais é considerada um indicador de que a coleta, o processamento e a análise das amostras foram apropriadamente realizados, indicando inclusive que o seu transporte do local de coleta até o laboratório foi adequadamente eficiente, preservando a infectividade dos vírus (VINJÉ et al, 2004).

Neste estudo, a taxa de detecção de enterovírus não-pólio foi de 80% (25/31), acima dos 30% esperados, conforme citado no manual da OMS (WHO, 2003), sendo detectados seis diferentes sorotipos de enterovírus não-pólio. Nossos resultados estão de acordo com estudos conduzidos por VINJÉ et al (2004), o qual relatou uma taxa de detecção de 91% de enterovírus; por MUELLER et al (2009) com relatos de detecção de 86-99%, em um estudo realizado na Argentina e por MOMOU et al (2012), com uma taxa de detecção de 81,4%. No Brasil, um estudo

realizado por SALVADOR (2011), no qual avaliou a ocorrência de enterovírus em amostras de lodo de esgoto, relatou a detecção de enterovírus em 83% das amostras analisadas.

Em regiões de clima temperado, a transmissão de enterovírus é altamente sazonal, com picos de transmissão no verão e no outono e redução no inverno. Em regiões de climas tropicais, a transmissão de enterovírus ocorre durante todo o ano, embora possam ser observados alguns picos sazonais (MINOR, 2004; KEW et al, 2005; KARGAR, SADEGHIPOUR; NATEGH, 2009).

Observamos no presente estudo que os enterovírus foram isolados em todos os meses, exceto nos meses de julho e agosto, nos quais não houve coleta e no mês de setembro, no qual não houve detecção de enterovírus. A sazonalidade dos enterovírus só poderia ser avaliada numa série histórica de, no mínimo, três anos.

Em apoio às atividades de erradicação global da poliomielite, o presente estudo teve como principal objetivo isolar e identificar os poliovírus a partir de águas residuárias coletadas em uma estação de tratamento de esgoto, no município do Rio de Janeiro, estabelecendo a vigilância ambiental no Laboratório de Enterovírus (LEV).

De uma forma geral, os dados apresentados neste estudo reforçam a vigilância ambiental como uma ferramenta no monitoramento da circulação de vírus entéricos no ambiente. Essa vigilância contribui para a avaliação da extensão e duração da circulação de poliovírus no ambiente, mesmo na ausência de casos relatados de paralisias flácidas agudas, auxiliando ainda no acompanhamento da eficiência das campanhas e estratégias de vacinação contra a poliomielite e na detecção e avaliação dos níveis de circulação de cepas de poliovírus vacinais, PVDVs e/ou selvagens (SHULMAN et al, 2000; ROIVAINEN et al, 2010; BLOMQVIST et al, 2012).

7 CONCLUSÕES

- Este estudo demonstrou uma alta taxa de detecção de enterovírus (87%), sendo caracterizados 29,6% de poliovírus e 70,4% de enterovírus não-pólio. Os três sorotipos de poliovírus detectados foram classificados como vacinais ou *Sabin like*.
- Não foram detectados PVDVs e poliovírus selvagens durante o período de estudo, embora tenha sido identificada a presença de mutações não-sinônimas em pontos de atenuação presentes nas cepas Sabin de referência.
- Os enterovírus não-pólio mais frequentemente isolados foram Echovírus 6 (40,7%) e Echovírus 7 (25,9%).
- De acordo com recomendações da OMS, a qual considera uma taxa de detecção de 30% de enterovírus não-pólio como satisfatória, conclui-se que as metodologias utilizadas neste estudo são adequadas para a vigilância ambiental dos poliovírus.
- A alta taxa de detecção aliada às mutações encontradas neste estudo reforça a necessidade de se manter a vigilância ambiental de poliovírus e enterovírus não-pólio.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliar a utilização de PCR em tempo real na vigilância ambiental de poliovírus.
- Analisar a possível presença de recombinações nos genes da protease 2C e polimerase 3D entre os poliovírus isolados.
- Analisar a presença de mutações na região 5'-NC dentre os poliovírus isolados.
- Realizar um estudo com um tamanho amostral que permita determinar a sazonalidade dos enterovírus no ambiente.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. Replicação do DNA, reparo e recombinação. In: ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 235-245.

ALBERTSON, P. Two-phase separation of viruses. In: MARAMOROSCH, K; KOPROWSKI, H. (Ed.). **Methods of virology**. New York: Academic Press Inc., 1967. p. 303-321.

ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

APOSTOL, L.N. Detection of non-polio enteroviruses from 17 years of virological surveillance of acute flaccid paralysis in the Philippines. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 84, p.624–631, 2012a.

APOSTOL, L.N.G. et al. Genetic diversity and molecular characterization of enteroviruses from sewage-polluted urban and rural rivers in the Philippines. **Virus Genes**, Norwell, v. 45, p.207-217, 2012b.

BLOMQVIST, S. et al. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 49-54, 2010.

_____. Detection of imported wild polioviruses and of vaccine-derived polioviruses by environmental surveillance in Egypt. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 15, p. 5406-5409, 2012.

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acid. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 5 ed. Brasília: FUNASA, 2002a. v. 1-2.

_____. **Vigilância ambiental em saúde**. Brasília: FUNASA, 2002b. 44 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Imunizações 30 anos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 212 p. (Série C. Projetos e Programas e Relatórios).

_____. **Campanha nacional de vacinação contra a poliomielite**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. 22p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/polio_1_etapa_2007.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Informe técnico da introdução da Vacina Inativada Poliomielite (VIP)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012a. 18 p.

_____. **Informe técnico Campanha para Atualização do Esquema Vacinal**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012b. 29p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações. **Informe técnico Campanha Nacional de Vacinação Contra a Poliomielite**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012c. 19p.

CAMPOS, A. L. V.; NASCIMENTO, D. R.; MARANHÃO, E. A história da poliomielite no Brasil e seu controle por imunização. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 573-600, 2003.

CARVALHO, L. H. F.; WECKX, L. Y. Uso universal da vacina inativada contra poliomielite. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 82, n. 3, 2006.

CASTILLO, Sarah M. (Trad.). **Virología**: capítulo diez: parte uno: picornavirus - enterovirus y características generales de los picornavirus. *Microbiology and Immunology On-line*, 2007. Disponível em: <<http://pathmicro.med.sc.edu/spanish-virology/spanish-chapter10-1.htm>>. Acesso em 23 fev. 2013.

CHATTERJEE, A. et al. Polio eradication in India: progress, but environmental surveillance and vigilance still needed. **Vaccine**, Kidlington, v. 31, n. 8, p. 1268-1275, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.12.060>>. Acesso em: 21 jan. 2013.

CHERNICHARO, C. et al. Pós-tratamento de efluentes anaeróbios por sistemas de desinfecção. In: CHERNICHARO, C.A.L. (Org). **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios: coletânea P858 de trabalhos técnicos**. Belo Horizonte: PROSAB, 2001. v. 2, cap. 7, p. 1-66.

CHONMAITREE, T.; MANN, L. Respiratory infections. In: ROTBARD, H.A. (Ed.). **Human enteroviruses infections**. Washington, DC: ASM Press, 1995. p. 255-270.

CHOWDHARY, R.; DHOLE, T.N. Interrupting wild poliovirus transmission using oral poliovirus vaccine: environmental surveillance in high-risks area of India. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 80, p. 1477-1488, 2008.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Norma Técnica L5.505**: Enterovirus - métodos de concentração de amostras de águas de esgoto: procedimento. São Paulo, SP. 2001. p. 16-19.

COMPANHIA ESTADUAL DE ÁGUAS E ESGOTOS (CEDAE). Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.cedae.com.br>>. Acesso em: 14 ago. 2011.

COSTA, E. A; ROZENFELD, S. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. IN: ROZENFELD, S (Org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2000. p. 15-40.

COSTA, E.V. **Sequenciamento e análise genômica do Poliovírus tipo 1, cepa LS-c, precursora imediata da vacina Sabin 1**. 1999. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

_____. **Perfil genômico dos poliovírus de origem vacinal isolados de casos de paralisias flácidas agudas, no Brasil, no período pós-eliminação dos poliovírus selvagens da Região das Américas**. 2011. 103 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)- Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

COZAC, M. C.; MIRANDA, T. M. T. A contaminação ambiental por vírus e a importância do reuso de efluente doméstico tratado na agricultura. In: MOSTRA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA DA PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU DA PUC GOIÁS, 4., 2009, Goiânia. **Anais eletrônicos...** Goiânia: PUC Goiás, 2009. Disponível em: < http://www.cpgls.ucg.br/home/secao.asp?id_secao=1062>. Acesso em: 28 maio 2013.

CUERVO, N.S. et al. Genomic features of intertypic recombinant Sabin poliovirus excreted by primary vaccines. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, p. 5740-5751, 2001.

DA SILVA, E. E.; AZEVEDO, J. P. R. A.; COSTA, E. V. Enteroviroses de importância médica. IN: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2005. p. 1681-1700.

DALLDORF, G.; MELNICK, J.L. Coxsackieviruses. In: HORSFALL JR., F.L.; TAMM, I. (Ed.). **Viral and rickettsial infections of man**. 4. ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1965. p. 474-512.

DAYAN, G.H. et al. Serologic response to inactivated poliovirus vaccine: a randomized clinical trial comparing 2 vaccination schedules in Puerto Rico. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 195, p. 12-20, 2007.

DEDEPSIDIS, E. et al. Retrospective characterization of a vaccine-derived poliovirus type 1 isolate from sewage in Greece. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 21, p. 6697-6704. 2007.

DESHPANDE, J.M.; SHETTY, S.J.; SIDDIQUI, Z.A. Environmental surveillance system to track wild poliovirus transmission. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 5, 2919-2927. 2003.

DIAMENT, A.J.; KOK, F. Poliomielite. In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 71-77.

DOWDLE, W.R. The principles of disease elimination and eradication. **Bulletin of the World Health Organization**, New York, v. 76, p. 23-25, 1998. supl. 2.

DOWDLE, W.R.; KEW, O. Vaccine-derived polioviruses: is it time to stop using the word "rare"? **The Journal Infectious Diseases**, Chicago, v. 194, n.5, p. 545-551. 2006.

ENGLAND, B. Concentration of virus by adsorption to and elution from AL(OH)₃. IN: LUND, E. **Manual on analyses for water pollution control**. Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe, 1977, p. 32-40.

ENTEROVÍRUS. ViralZone Expaty. Disponível em:
<http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html>. Acesso em 21 fev. 2013.

FADEN, H. et al. Comparative evaluation of immunization with live attenuated and enhanced-potency inactivated trivalent poliovirus vaccines in childhood: systemic and local immune responses. **The Journal Infectious Diseases**, Chicago, v. 162, p. 1291-1297, 1990.

GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE. **Protection polio-free areas**. 2011a. Disponível em: <http://www.polioeradication.org/Portals/0/Document/AnnualReport/AR2011/GPEI_AR2011_A4_EN_WEB_Section_5.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2013.

_____. **Polio eradication – an Emergency**. 2011b. Disponível em: <http://www.polioeradication.org/Portals/0/Document/AnnualReport/AR2011/GPEI_AR2011_A4_EN_WEB_Section_6.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2013.

_____. **Off track: Nigeria, Pakistan, Afghanistan**. 2011c. Disponível em: <<http://www.polioeradication.org/ResourceLibrary/StrategyAndWork/AnnualReports.aspx>>. Acesso em: 03 mar. 2013.

_____. **Polio and prevention, infected countries; data and monitoring; post-eradication**. 2011d. Disponível em: <<http://www.polioeradication.org>>. Acesso em: 10 jun. 2011.

_____. **Infected countries**, 2013a. Disponível em: <<http://www.polioeradication.org>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

_____. **Polio eradication and endgame strategic plan – working DRAFT 08 Feb 2013**. 2013b. Disponível em: <<http://www.polioeradication.org/ResourceLibrary/Strategyandwork.aspx#sthash.dfc5UE8l.dpuf>>. Acesso em: 24 mar. 2013.

_____. **Circulating vaccine-derived poliovirus1 (cVDPV) 2000-2013**, 2013c. Disponível em: <<http://www.polioeradication.org/Dataandmonitoring/Poliothisweek/Circulatingvaccinederivedpoliovirus.aspx>>. Acesso em: 28 maio 2013.

ENTEROVIRUS. The Picornavirus Page. Disponível em: <<http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>>. Acesso em: 20 fev. 2013.

GLOBAL polio eradication: strategic plan 2010-2012. Geneva: WHO Press, 2010. Disponível em: <<http://www.polioeradication.org/content/publications/GPEI.StrategicPlan.2010-2012.ENG.May.2010.pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2013.

GOURVILLE, E., et al. Global surveillance and the value of information: the case of the global polio laboratory network. **Risk Analysis**, New York, v. 26, n. 6, p. 1557-1569, 2006.

GREENING, G.E, HEWITT, J.; LEWID, D.G. Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, p. 745-750, 2002.

GREGIO, C.R.V. **Caracterização genômica de poliovírus derivado da vacina isolada a partir de amostras ambientais**. 2006. 118f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária)- Instituto de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

GUIMARÃES, F.R. **Aplicação de metodologia de concentração viral para detecção de astrovírus em águas ambientais**. 2007. 92f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária)- Instituto de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, n.41, p. 95-98, 1999.

HOVI, T. et al. Poliovirus surveillance by examining sewage specimens. Quantitative recovery of virus after introduction into sewerage at remote upstream location. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 127, p. 101-106, 2001.

_____. Evolution of wild-type 1 poliovirus in two healthy siblings excreting the virus over a period of 6 months. **The Journal of General Virology**, London, v. 85, p. 369-377, 2004.

HOVI, T. Surveillance for polioviruses. **Biologicals**, London, v.34, p. 123-126, 2006.

HOVI, T. et al. Role of environmental poliovirus surveillance in global polio eradication and beyond. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 140, p. 1-13, 2012.

HSU, C.-H. et al. Epidemiologic and clinical features of non-polio enteroviral infections in northern Taiwan in 2008. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taiwan, v. 44, 265-273, 2011.

HUANG, Q.S. et al. Persistence of oral polio vaccine virus after its removal from the immunization schedule in New Zealand. **The Lancet**, London, v. 366, p. 396-396, 2005.

HULL, H.F. et al. Paralytic poliomyelitis: seasoned strategies, disappearing disease. **The Lancet**, London, v. 343, p. 1331-1337, 1994.

IBGE. IBGE divulga as estimativas populacionais para os municípios brasileiros 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_imprensa.php?id_noticia=2204>. Acesso em: 22 fev. 2013.

IMUNIZAÇÕES - cobertura – Brasil. Programa Nacional de Imunizações (PNI). Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?pni/cnv/cpniuf.def>>. Acesso em: 28 mar. 2013.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>>. Acesso em: 20 fev. 2013.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; MEGSON, B.; GRAY, J. Molecular detection and characterization of Human Enterovirus directly from clinical samples using RT-PCR and DNA sequencing. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 78, p. 243-253, 2006.

JAYKUS, L.A. Epidemiology and detection as option for control of viral and parasitic foodborne disease. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 3, p. 529-539, 1997.

KARGAR, M., SADEGHIPOUR, S.; NATEGH, R. Environmental surveillance of non-polio enteroviruses in Iran. **Virology Journal**, London, v. 6, p. 149, 2009.

KATAYAMA, H., SHIMASAKI, A. and OHGAKI, S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1033-1039, 2002.

KAWAMURA, N. et al. Determinants in the 5' noncoding region of poliovirus Sabin 1 RNA that influence the attenuation phenotype. **Journal of Virology**, Washington, v. 63, p. 1302–1309, 1989.

KEW, O. M. et al. Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 2893-2899, 1998.

_____. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulation type 1 vaccine-derived poliovirus. **Science**, Washington, v. 296, p. 356-359, 2002.

_____. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 587-635, 2005.

KHETSUARIANI, N., et al. High degree of genetic diversity of non-polio enteroviruses identified in Georgia by environmental and clinical surveillance, 2002-2005. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 59, p. 1340-1347, 2010.

KHODAEI, S.H. et al. Environmental surveillance of polio and non-polio enteroviruses in Sistan and Balouchestan Province. **Iranian Journal Public Health**, Iran, v. 37, n. 3, p. 127-133, 2008.

KILPATRICK, D.R. et al. Group-specific identification of poliovirus by PCR using iniciadores containing mixed-base or deoxyinosine residues at positions of codon degeneracy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 12, p. 2990-2996, 1996.

KILPATRICK, D.R. et al. Serotype-specific identification of poliovirus by PCR using iniciadores containing mixed-base or deoxyinosine residues at positions of codon degeneracy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 2, p. 352-357, 1998.

_____. Rapid Group-, Serotype-, and Vaccine Strain-Specific Identification of Poliovirus Isolates by Real-Time Reverse Transcription-PCR Using Degenerate Primers and Probes Containing Deoxyinosine Residues. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 6, p. 1939-1941, 2009.

KITAMURA, N. et al. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. **Nature**, Philadelphia, v. 291, n. 5816, p. 547-553, 1981.

KLINGEL K. et al. Ongoing enterovirus induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. **Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, p. 314-318, 1992.

KNOWLES, N.J. et al. Picornaviridae. In: KING, A.M.Q. et al (Ed.). **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses**: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2012. p. 855-880.

LEWIS, G.D.; METCALF, T.G. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p. 1983-1988, 1988.

LODDER, W.J. et al. Feasibility of quantitative environmental surveillance in poliovirus eradication strategies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n.11, p. 3800-3805, 2012.

MACADAM, A.J. et al. Genetic basis of attenuation of the Sabin type 2 vaccine strain of poliovirus in primates. **Virology**, New York, v. 192, p. 18-26, 1993.

MANOR, Y. et al. Advanced environmental surveillance and molecular analyses indicate separate importations rather than endemic circulation of wild type 1 poliovirus in Gaza District in 2002. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 18, p. 5954-5958, 2007.

MARTINEZ, C.V. et al. Shedding of Sabin poliovirus Type 3 containing the nucleotide 472 uracil-to-cytosine point mutation after administration of oral poliovirus vaccine. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 190, n. 2, p. 409-416, 2004.

MELNICK, J.L. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.). **Fields Virology**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. v.2. p.655-712.

MICHOS, A.G. et al. Aseptic meningitis in children: analysis of 506 cases. **PLoS One**, San Francisco, v. 2, n. 8, e674, 2007.

MINOR, P.D. et al. Effect of different immunization schedules on the excretion and reversion of oral poliovaccine strains. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 75, p. 153-160, 2004.

MINOR, P. Vaccine-derived poliovirus (VDPV): Impact on poliomyelitis eradication. **Vaccine**, Kidlington, v. 27, p. 2649-2652, 2009.

MODLIN, J.F. Poliomyelitis and poliovirus immunization. In: ROTBART, H.A. (Ed.). **Human Enterovirus Infections**. Washington: ASM Press, 1995. p.195-220.

_____. The bump road to polio eradication. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 362, n. 25, p. 2351-2360, 2010.

MOMOU, K.J. et al. Détection d'entérovirus dans les eaux uses urbaines à Yopoygon, Abidjan. **Pathologie Biologie**, Paris, v. 60, n. 3, p. e21-e26, 2012.

MOORE, M.; MORENS, D.M. Enteroviruses, including polioviruses. In: BELSHE, R.B (Ed.). **Human Virology**. USA: PSG Publishing Company, 1984. p. 407-483.

MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT (MMWR). Update: Eradication of Paralytic Poliomyelitis in the Americas. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 41, n. 36, p.1-2, 1992.

_____. Progress toward global eradication of poliomyelitis, 1988-1991. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 42, n. 25, p. 486-487, p. 493-495, 1993.

_____. Laboratory Surveillance for Wild and Vaccine-Derived Polioviruses, January 2002-June 2003. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 52, p. 901-932, 2003.

_____. Update on Vaccine-Derived Polioviruses Worldwide, January 2008-June 2009. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 58, n. 36, p. 1002-1006, 2009.

_____. Progress toward interruption of wild poliovirus transmission - worldwide, January 2011 - March 2012. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 61, n. 19, p. 353-357, 2012.

MUELLER, E.J. et al. Environmental poliovirus surveillance during oral poliovirus vaccine and inactivated poliovirus vaccine use in Cordoba Province, Argentina. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 5, p. 1395-1401, 2009.

MURRAY, K.E.; BARTON, D.J. Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, n. 8, p. 4739-4750, 2003.

NASH, D. et al. The outbreak of *West Nile virus* infection in the New York City area in 1999. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 344, n. 24, p. 1807-1814, 2001.

NOMOTO, A.; ARITA, I. Eradication of Poliomyelitis. **Nature Immunology**, New York, v. 3, n. 3, p. 205-208, 2002.

OBERSTE, M.S. et al. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 3, p. 1170-1174, 2000.

_____. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 26, p. 375-377, 2003.

OBERSTE, M.S.; PALLANSCH, M.A. Establishing evidence for Enterovirus infection in chronic disease. **Annals of The New York Academy of Sciences**, New York, v. 1005, p. 23-31, 2003.

OKAYASU, H. et al. Mucosal immunity and poliovirus vaccines: impact on wild poliovirus infection and transmission. **Vaccine**, Kidlington, v. 29, p. 8205-8214, 2011.

PADILHA, G.S. et al. Efeitos do pH e massa molar do polímero sobre o sistema bifásico aquoso PEG/fosfato. **Acta Scientiarum Technology**, Maringa, v. 33, n. 1, p. 1-4, 2011.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Director announces campaign to eradicate poliomyelitis from Americas by 1990. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, Washington, v. 19, p. 213-215, 1985.

PALLANSCH, M.A.; ROOS, R.P. Enteroviruses: Poliovirus, Coxsackievirus, Echovirus and newer Enterovirus. In: KNIPE, D.M. et al. **Fields virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 723-777.

PALMEIRA, G. Epidemiologia. In: ROZENFELD, S. **Fundamentos da vigilância sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, 2003. p. 135-194.

PEARCE, J.M.S. Poliomyelitis (Heine-Medin disease). **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 76, p. 128, 2005.

PLIAKA, V. et al. Retrospective molecular and phenotypic analysis of poliovirus vaccine strains isolated in Greece. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 17, p. 1554-1562, 2011.

PRESCOTT, L.; HARLEY, J.; KLEIN, D. Microbiology. 3. ed. Boston: WCB Publishers, 1996. p. 935.

POLIOMIELITE. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_poliomielite.pdf>. Acesso em: 18 mar. 2013.

POLIOMYELITIS. World Health Organization (WHO). Disponível em: <http://www.who.int/topics/poliomyelitis/en/>. Acesso em: 12 fev. 2013.

POYRY, T.; STENVIK, M.; HOVI, T. V. Viruses in sewage waters during and after a poliomyelitis outbreak and subsequent nationwide oral poliovirus vaccination campaign in Finland. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 2, p. 371-374, 1988.

RACANIELLO, V. R. Picornaviridae: The viruses and their replication. IN: KNIPE, D.M. et al (Ed.). **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 685-723.

RAMSINGH, A.I. CVB-induced pancreatitis and alterations in gene expression. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 323, p. 241-58, 2008.

RELAÇÕES Bilaterais. Ministério Das Relações Exteriores. Disponível em: <<http://www.itamaraty.gov.br/temas/temas-politicos-e-relacoes-bilaterais>>. Acesso em: 28 abr. 2013.

RHOADES, R.E. et al. Enterovirus Infections of the Central Nervous System Review. **Virology**, New York, v. 411, n. 2, p. 288-305, 2011.

RICO-HESSE, R. et al. Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. **Virology**, New York, v. 160, p. 311-322, 1987.

RISI Jr, J.B. The control of poliomyelitis in Brazil. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, n. 6, p. 400-403, 1984.

ROIVAINEN, M. et al. Highly divergent neurovirulent vaccine-derived polioviruses of all three serotypes are recurrently detected in Finnish sewage. **Euro Surveillance**, Stockholm, v. 15, n. 19, pii-19566, 2010. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19566>>. Acesso em: 08 nov. 2010.

ROTBART, H. Meningitis and encephalitis. In: ROTBART, H. (Ed.). **Human Enterovirus Infections**. Washington, DC: ASM Press, 1995. p. 271–289.

ROUCHARD, M.J.; LAM, D.H.; RACANIELLO, V.R. Determinants of attenuation and temperature sensitivity in the type 1 poliovirus Sabin vaccine. **Journal of Virology**, Washington, v. 69, p.4972-4978,1995.

RUECKERT, R.R. Picornaviridae: The virus and their replication. In: FIELDS, B.N. et al. **Fields virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers, 1996. p. 2231-2295.

SALVADOR, R.M. **Detecção e quantificação de *Enterovirus* em lodo de esgoto provenientes de estações de tratamento de esgotos com potencial uso na agricultura do Estado de São Paulo**. 2011. 72f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)- Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SCHATZMAYR, H.G. et al. Erradicação da poliomielite no Brasil: a contribuição da Fundação Oswaldo Cruz. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 11-24, 2002.

SCHLINDWEIN, A.D. **Pesquisa de vírus entéricos humanos em amostras de lodo da estação de tratamento de esgoto (sistema insular) de Florianópolis, SC: padronização e avaliação de técnicas moleculares e de cultura celular na detecção e viabilidade viral**. 2009. 147f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SHULMAN, L.M et al. Molecular and antigenic characterization of a highly evolved derivative of the type 2 oral poliovaccine strain isolated from sewage in Israel. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 10, p. 3729-3734, 2000.

SILVA, E. E. et al. Evidence of enterovirus 71 infections in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 131-132, 1990.

SILVA, E. E.; WINKLER, M. T.; PALLANSCH, M. A. Role of enterovirus 71 in acute flaccid paralysis after the eradication of poliovirus in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 2, n. 3, p. 231-233, 1996.

SHIEH, Y.S. et al. Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 54, p. 51-66, 1995.

TAM, P.E.; MESSNER, R.P. Molecular mechanisms of coxsackievirus persistence in chronic inflammatory myopathy: viral RNA persists through formation of a double-stranded complex without associated genomic mutations or evolution. **Journal of Virology**, London, v. 73, p.10113–10121, 1999.

TAMURA, K. et al. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p.1596-1599, 2007.

TATEM, J.M. et al. A mutation present in the amino terminus of Sabin 3 poliovirus. **Journal of Virology**, London, v. 66, p. 3294-3197, 1992.

TAVARES, T.M.; CARDOSO, D.D.P.C; BRITO, W.M.E.D. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 34, n. 2, p. 85-104, 2004.

TEIXEIRA, C.F.; PAIM, J.S.; VILASBÔAS, A. L. SUS, modelos assistenciais e Vigilância da Saúde. In: ROZENFELD, S. (Org.). **Fundamentos da vigilância Sanitária**. Rio de janeiro: Ed. Fiocruz, 2000. p. 49-60.

TSAI, Y. L. et al. simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis a virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 10, p.3488-3491, 1993.

VANTARAKIS, A.; PAPAPETROPOULOU, M. Detection of enteroviruses, adenoviruses and hepatitis a viruses in raw sewage and treated effluents by Nested-PCR. **Water, Air & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 114, n. 1-2, p. 85-93, 1999.

VILELA, Ana Luisa Miranda. Sistema nervoso: medula e SNP. Brasília: Anatomia e Fisiologia Humanas. Disponível em: <<http://www.afh.bio.br/nervoso/nervoso4.asp>>. Acesso em: 13 fev. 2013.

VINJÉ, J. et al. Isolation and characterization of circulation type 1 vaccine derived poliovirus from sewage and stream waters in Hispaniola. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, p. 1168-1175, 2004.

WALDMAN, E. A.; SILVA, L. J.; MONTEIRO, C. A. Trajetória das doenças infecciosas: da eliminação da poliomielite à reintrodução da cólera. **Informe Epidemiológico do SUS**, Brasília, v. 8, n. 3, p. 5-47, 1999.

WEEKS-LEVY, C. et al. Identification and characterization of a new base substitution in the vaccine strain of Sabin 3 poliovirus. **Virology**, New York, v. 185, p. 934-937, 1991.

WELCOME to the home of Picornaviruses. Picornavirus. Disponível em: <<http://www.picornaviridae.com>>. Acesso em: 20 fev. 2013.

WESTROP, G.D. et al. Genetic basis of attenuation of the Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. **Journal of Virology**, London, v. 63, p. 1338-1344, 1989.

WIMMER, E.; HELLEN, C.U.T.; CAO, X. Genetics of poliovirus. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 27, p. 353-436, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health assembly global eradication of poliomyelitis by the year 2000**. Geneva: WHO Press, 1988. 1p.

_____. Global disease elimination and eradication as public health strategies. **Bulletin of the World Health Organization**, New York, v. 76, n. 2, p. 1-162, 1998.

_____. **Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation**. Geneva: WHO Press, 2003. 28p.

_____. **Polio laboratory manual**. 4. ed. Geneva: WHO Press, 2004. 157p.

_____. Advisor Committee on the poliomyelitis eradication: recommendations on the uses of bivalent oral poliovirus vaccine types 1 and 3. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 84, p. 289-300, 2009.

YAKOVENKO, M.L. et al. Antigenic evolution of vaccine-derived polioviruses: changes in individual epitopes and relative stability of the overall immunological properties. **Journal of Virology**, London, v. 80, p. 2641-2653, 2006.

YAMAZAKI, K.; OISHI, I.; MINEKAWA, Y. Nucleotide sequence analysis of recent epidemic strains of enterovirus 70. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 39, p. 429 – 432, 1995.

YAMAYOSHI, S. et al. Human SCARB2-dependent infection by Coxsackievirus A7, A14, and A16 and Enterovirus 71. **Journal of Virology**, London, v. 86, n. 10, p. 5686-5696, 2012.

YANG, C.F. et al. Detection and identification of vaccine-related polioviruses by the polymerase chain reaction. **Virus Research**, Amsterdam, v. 20, p. 159-179, 1991.

_____. Genotype-specific *in vitro* amplification of sequences of the wild type 3 polioviruses from Mexico and Guatemala. **Virus Research**, Amsterdam, v. 24, p. 277-296, 1992.

YANG, F. et al. Survey of Enterovirus Infections from Hand, Foot and Mouth Disease Outbreak in China, 2009. **Virology Journal**, London, v.8, p. 508, 2011.

ZURBRIGGEN, S. et al. Isolation of sabin-like polioviruses from wastewater in a country using inactivated polio vaccine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 18, p. 5608-5614, 2008.

ANEXO A - "3º TERMO ADITIVO AO ACORDO DE COOPERAÇÃO TÉCNICA CELEBRADO ENTRE A FIOCRUZ E CEDAE."



Ministério da Saúde

FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz
Diretoria de Planejamento Estratégico

Processo Fiocruz nº 25380.003142/2009-79
Processo Cedaee nº E - 17/100.905/2011

Aditivo nº 03 ao Acordo de Cooperação Técnica celebrado entre a **FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ** e a **COMPANHIA ESTADUAL DE ÁGUAS E ESGOTOS - CEDAE**, na forma abaixo:

A **FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ** e a **COMPANHIA ESTADUAL DE ÁGUAS E ESGOTOS - CEDAE**, já qualificada no contrato original, por seus representantes legais e neste ato, a primeira, representada pela sua Diretora Dr^a. Tânia Cremonini de Araujo Jorge, portadora da Carteira de Identidade nº 2.564.989 IFP/RJ, CPF nº 403.241, conforme autorização da Diretoria da CEDAE, em reunião realizada em 09 de Novembro de 2011, têm ajustado entre si, o presente aditivo, que se regerá pelas normas contidas na Lei nº 8.666, de 21 de junho de 1993 e suas modificações, no que couber, bem como pelas cláusulas seguintes:

CLÁUSULA PRIMEIRA - DA FINALIDADE

Em conformidade com a "Cláusula Terceira - Dos Aditamentos", do referido Acordo de Cooperação, o presente Termo Aditivo tem por finalidade "**Vigilância ambiental dos poliovírus em apoio às atividades de erradicação global da poliomielite**", vinculado ao Laboratório de Enterovírus/FIOCRUZ do IOC.

CLÁUSULA SEGUNDA - DO PLANO DE TRABALHO

Integra este Instrumento, independentemente de transcrição, o Plano de Trabalho, elaborado de comum acordo entre as partes, concernente à execução da finalidade descrita na Cláusula Primeira.

CLÁUSULA TERCEIRA - DAS OBRIGAÇÕES DA FIOCRUZ

A **FIOCRUZ**, através da sua unidade o Instituto Oswaldo Cruz / Laboratório de Referência Nacional para Enterovirose, compromete-se a:

3.1 - Coletar amostras de esgoto não tratado que atende uma população de 300.000 a 1.500.000 podendo variar a frequência de coleta de 1x/mês a 1x/semana, no volume de 1L

CLÁUSULA QUARTA - DAS OBRIGAÇÕES DA CEDAE

A **CEDAE**, através da sua Diretoria de Produção e Grande Operação, compromete-se a:

4.1 - Disponibilizar amostras de águas residuárias e lodo de estações de tratamento de esgoto (ETE), de acordo com os projetos apresentados;

CLÁUSULA QUINTA - DA GESTÃO

Serão responsáveis pela condução dos trabalhos referentes ao presente Termo Aditivo os profissionais que forem indicados pela Fundação Oswaldo Cruz e pela Companhia Estadual de Águas e Esgotos através de documentos com essa finalidade, que passarão a integrar o presente Termo Aditivo.



Av. Pres. Vargas, 2655 . Cidade Nova . Rio de Janeiro . CEP 20.210-03
www.cedaee.com.br





Ministério da Saúde

FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz
Diretoria de Planejamento Estratégico

CLÁUSULA SEXTA - DA VIGÊNCIA

O presente Termo Aditivo terá vigência a partir da data de sua assinatura até o vencimento do Acordo de Cooperação Técnica.

CLÁUSULA SÉTIMA - DA PUBLICAÇÃO

A **FIOCRUZ**, como condição de eficácia, providenciará a publicação do presente Termo Aditivo, por extrato, no Diário Oficial da União - D.O.U., até o 5º (quinto) dia útil do mês seguinte ao de sua assinatura, para ocorrer no prazo de 20 (vinte) dias a contar daquela data.

CLÁUSULA OITAVA - DA RATIFICAÇÃO

Ratificam-se as demais cláusulas e condições do Acordo de Cooperação, ora aditado, não especificamente alteradas por este Instrumento, que àquele se integra para um só efeito.

E, por estarem assim, justos e acordados, assinam o presente diante de testemunhas.

Rio de Janeiro, 17 de novembro de 2011.

Pela **FIOCRUZ**:

Tânia Cremonini de Araújo Jorge
TÂNIA CREMONINI DE ARAÚJO JORGE
Diretora

Pela **CEDAE**:

Wagner Granja Victer
WAGNER GRANJA VICTER
Diretor-Presidente

Jorge Luiz Ferreira Briard
JORGE LUIZ FERREIRA BRIARD
Diretor de Produção e Grande Operação

TESTEMUNHAS:

Le Cavalho Filho

Ad-03-Acordo-Cooperação-FIOCRUZ-P



Av. Pres. Vargas, 2655 . Cidade Nova . Rio de Janeiro . CEP 20.210-03
www.cedae.com.br



ANEXO B - "PUBLICAÇÃO NO DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, EM 04 DE JANEIRO DE 2012, DO 3º TERMO ADITIVO AO ACORDO DE COOPERAÇÃO TÉCNICA ENTRE FIOCRUZ E CEDAE"



130

ISSN 1677-7069

Diário Oficial da União - Seção 3

Nº 3, quarta-feira, 4 de janeiro de 2012

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
DIRETORIA DE ADMINISTRAÇÃO

EXTRATO DE CONTRATO Nº 34/2011 UASG 254420

Nº Processo: 2538000028720101.
INEXIGIBILIDADE Nº 16/2011 Contratante: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - CNPJ Contratado: 33131099000149. Contratado CARL ZEISS DO BRASIL LTDA - Objeto: Prestação de serviços de manutenção preventiva do microscópio confocal a Laser Zeta, pelo período de 3 meses, podendo ser prorrogado conforme o projeto básico. Fundamento Legal: art. 25, Lei 8666/93, Lei 10522/02 INO/2008 e outras. Vigência: 29/12/2011 a 29/05/2012. Valor Total: R\$23.954,00. Fone: 151000000 - 2011NE807850. Data de Assinatura: 29/12/2011.

(SICON - 03/01/2012) 254425-25201-2011NE800091

RESULTADO DE JULGAMENTO
PREGÃO Nº 1382011

A Pregoeira no uso de suas atribuições declara vencedora da licitação as empresas: NATULAB LABORATORIO S/A no item 05, valor total de R\$ 38.700,00; CIMED INDUSTRIA DE MEDICAMENTOS LTDA nos itens 08, 32 e 53, valor total de R\$ 1.891.500,00; GEOLAB INDUSTRIA FARMACEUTICA S/A nos itens 29 e 33, valor total de R\$ 2.520.000,00; FARMACEUTICA QUIMICA FARMACEUTICA CIARENSE LTDA no item 01, valor total de R\$ 39.600,00; ACX-MEDICAMENTOS LTDA no item 38, valor total de R\$ 31.992,00; A7 DISTRIBUIDORA DE MEDICAMENTOS LTDA EPP no item 24, valor total de R\$ 196.200,00; LABORATORIO TEUTO BRASILEIRO S/A nos itens 37 e 41, valor total de R\$ 350.635,00; MEQUIMICA INDUSTRIA FARMACEUTICA LTDA no item 47, valor total de R\$ 1.950.000,00; HOSPAR IND E COM DE PRODUTOS HOSPITALARES LTDA no item 17, valor total de R\$ 17.500,00; VITAPAN INDUSTRIA FARMACEUTICA LTDA no item 15, valor total de R\$ 384.000,00; MERCK S/A no item 12, valor total de R\$ 8.900.000,00; GLAXOSMITHKLINE BRASIL LTDA no item 02, valor total de R\$ 3.450,00; BII FARMACOMERCIO LTDA nos itens 10 e 42, valor total de R\$ 1.160.000,00; CAZI QUIMICA FARMACEUTICA INDUSTRIA E COMERCIO LTDA no item 48, valor total de R\$ 130.000,00; CRISTALIA PRODUTOS QUIMICOS FARMACEUTICOS LTDA nos itens 09 e 50, valor total de R\$ 156.700,00; BIOLAB SANIUS FARMACEUTICA LTDA nos itens 06 e 25, valor total de R\$ 1.725.000,00; COMERCIAL CIRURGICA RIOCARENSE LTDA nos itens 16, 40 e 46, valor total de R\$ 3.755.400,00; PRATI, DONADUZZI E CIA LTDA nos itens 03, 04, 11, 13, 14, 19, 20, 21, 22, 28, 31, 36, 39, 43, 44, 45, 49, 51 e 52, valor total de R\$ 6.854.880,00; PRODIET FARMACEUTICA S/A no item 20, valor total de R\$ 51.450,00; MULTILAB INDUSTRIA E COMERCIO DE PRODUTOS FARMACIA LTDA no item 27, valor total de R\$ 519.000,00. Fone: em anexo nos itens 07, 18, 23, 26, 34 e 35. Valor Total da Licitação R\$ 31.936.007,00.

MARCIA GUIMARAES DE SOLZA
Pregoeira

(SIDEC - 03/01/2012) 254419-25201-2011NE800075

DEPARTAMENTO DE OPERAÇÕES COMERCIAIS
SERVIÇO DE ADMINISTRAÇÃO DE MATERIAIS
SEÇÃO DE PATRIMÔNIO

EXTRATOS DE DOAÇÃO

Termo de Doação nº 01 celebrado entre a Fundação Oswaldo Cruz, CNPJ 33.781.055/0001-35, sediada na Av. Brasil, 4.365 - Mangueiras - Rio de Janeiro/RJ e o Município de Betim, sediado na Rua Professor Oswaldo Franco, nº 52, Centro - Betim/MG, CEP: 32.510-050, CNPJ: 18.715.391/0002-77. Unidade: Betim. Objeto: o presente termo tem por objeto a doação dos bens móveis e equipamentos do FioCruz aquele Estado nas condições específicas deste instrumento, com vistas ao desenvolvimento do Programa Farmácia Popular do Brasil, coordenado pelo Ministério da Saúde.

Termo de Doação nº 02 celebrado entre a Fundação Oswaldo Cruz, CNPJ 33.781.055/0001-35, sediada na Av. Brasil, 4.365 - Mangueiras - Rio de Janeiro/RJ e o Município de Camaragibe, sediado na Avenida Beirão Correia, nº 2340, Timbó - Camaragibe/PE, CEP: 57.768-000, CNPJ: 08.260.663/0001-57. Unidade: Camaragibe. Objeto: o presente termo tem por objeto a doação dos bens móveis e equipamentos do FioCruz aquele Estado nas condições específicas deste instrumento, com vistas ao desenvolvimento do Programa Farmácia Popular do Brasil, coordenado pelo Ministério da Saúde.

Termo de Doação nº 03 celebrado entre a Fundação Oswaldo Cruz, CNPJ 33.781.055/0001-35, sediada na Av. Brasil, 4.365 - Mangueiras - Rio de Janeiro/RJ e o Município de São Gabriel da Cachoeira/AM sediada na Avenida Alvaro Maia, nº 269, Centro - São Gabriel da Cachoeira, CEP: 69.750-000, CNPJ: 04.272.670/0001-18. Unidade: São Gabriel da Cachoeira. Objeto: o presente termo tem por objeto a doação dos bens móveis e equipamentos do FioCruz aquele Estado nas condições específicas deste instrumento, com vistas ao desenvolvimento do Programa Farmácia Popular do Brasil, coordenado pelo Ministério da Saúde.

Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico <http://www.in.gov.br/imprensa/diario>, pelo código 0003201201040130.

DIRETORIA DE ADMINISTRAÇÃO DO CAMPUS
EXTRATO DE TERMO ADITIVO Nº 2/2011 UASG 254437

Número do Contrato: 26/2011.
Nº Processo: 25380000077201002.
TOMADA DE PREÇOS Nº 6/2010 Contratante: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - CNPJ Contratado: 03905428000171. Contratado SEMA ENGENHARIA DE TELECOMUNICAÇÕES LTDA. Objeto: Execução da obra de reforma do Pavilhão 032-Prédio da Zoonose do IPEC. Fundamento Legal: Art. 65 §1º da Lei 8666/93 e suas alterações. Vigência: 09/12/2011 a 12/12/2011. Valor Total: R\$716.222. Fone: 151000000 - 2011NE802415. Data de Assinatura: 09/12/2011.

(SICON - 03/01/2012) 254420-25201-2011NE800074

CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
EXTRATO DE CONTRATO Nº 41/2011 UASG 254423

Nº Processo: 25381000261201184.
PREGÃO SIAPP Nº 71/2011 Contratante: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - CNPJ Contratado: 03905428000171. Contratado ACQUAQUALITY SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ÁGUA LTDA. Objeto: Contratação de serviços de manutenção preventiva, corretiva e técnica periódica dos elementos filtrantes do sistema de tratamento de água tipo 1 do CPqRR/FIOCRUZ, por um período de 12 (doze) meses. Fundamento Legal: Art. 61, parágrafo único, Lei 8.666/93. Vigência: 07/12/2011 a 06/12/2012. Valor Total: R\$20.280,00. Fone: 151000000 - 2011NE800688. Data de Assinatura: 07/12/2011.

(SICON - 03/01/2012) 254423-25201-2011NE800072

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO
CHAGAS
EXTRATOS DE REGISTRO DE PREÇOS

Ata de Registro de Preço nº164/2011. Objeto: Registro de Preços objetivando o fornecimento de Eletrodinâmicos. Contratada: POLICARBON BRASIL IND. DE FILTROS E BEBEDOUROS LTDA, CNPJ: 02.341.945/0001-00. Item: 03. Vigência: 12 (doze) meses a partir da publicação no D.O.U. Modalidade de Licitação: Pregão Eletrônico nº 079/2011 - IPEC. Processo: 25380.003548/2011-76. Valor Global: R\$ 3.755,00 (Três Mil Setecentos e Cinquenta e Cinco Reais).

Ata de Registro de Preço nº165/2011. Objeto: Registro de Preços objetivando o fornecimento de Eletrodinâmicos. Contratada: VITEC COM. DE MAT. PARA ESCRITÓRIO E SERVIÇOS LTDA, CNPJ: 05.207.424/0001-45. Item: 05. Vigência: 12 (doze) meses a partir da publicação no D.O.U. Modalidade de Licitação: Pregão Eletrônico nº 079/2011 - IPEC. Processo: 25380.003548/2011-76. Valor Global: R\$ 1.480,00 (Hum Mil Quatrocentos e Oitenta e Seis Reais).

Ata de Registro de Preço nº166/2011. Objeto: Registro de Preços objetivando o fornecimento de Eletrodinâmicos. Contratada: VITEC COM. DE MAT. PARA ESCRITÓRIO E SERVIÇOS LTDA, CNPJ: 05.207.424/0001-45. Item: 05. Vigência: 12 (doze) meses a partir da publicação no D.O.U. Modalidade de Licitação: Pregão Eletrônico nº 079/2011 - IPEC. Processo: 25380.003548/2011-76. Valor Global: R\$ 1.644,65 (Hum Mil Seiscentos e Quarenta e Quatro Reais e Sessenta e Cinco Centavos).

Ata de Registro de Preço nº167/2011. Objeto: Registro de Preços objetivando o fornecimento de Eletrodinâmicos. Contratada: LEAL PORTO EMPREENDIMENTOS E PARTICIPAÇÕES LTDA, CNPJ: 27.640.990/0001-23. Item: 06. Vigência: 12 (doze) meses a partir da publicação no D.O.U. Modalidade de Licitação: Pregão Eletrônico nº 079/2011 - IPEC. Processo: 25380.003548/2011-76. Valor Global: R\$ 6.180,00 (Seis Mil Cento e Oitenta Reais).

RESULTADO DE JULGAMENTO
PREGÃO Nº 79/2011

O Pregoeiro no uso das suas atribuições que lhe confiere a Portaria nº 01/2011 declara como vencedora do Pregão Eletrônico SRP 079/2011 as seguintes empresas: POLICARBON BRASIL IND. DE FILTROS E BEBEDOUROS LTDA no item 03, no valor total de R\$ 3.755,00 (Três Mil Setecentos e Cinquenta e Cinco Reais); VITEC COMERCIO, MANUFATURAS, IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO no item 02, no valor total de R\$ 1.644,65 (Hum Mil Seiscentos e Quarenta e Quatro Reais e Sessenta e Cinco Centavos); MAXIMUS RIO COM. E SERV. LTDA no item 01, no valor total de R\$ 34.846,00 (Trinta e Quatro Mil Oitocentos e Quarenta e Seis

Reais); ADVANCED COM. DE MA. E SERVIÇOS LTDA no valor total de R\$ 1.060,00 (Mil Sessenta e Seis Reais); LEAL PORTO EMPREENDIMENTOS E PARTICIPAÇÕES LTDA no item 06 no valor total de R\$ 6.180,00 (Seis Mil Cento e Oitenta Reais); FERREZENDO O VALOR TOTAL DA LICITAÇÃO DE R\$ 48.965,65 (QUARENTA E OITO MIL NOVECENTOS E SESSENTA E CINCO REAIS E SESSENTA E CINCO CENTAVOS).

PAULO HENRIQUE DA COSTA FERREIRA

(SIDEC - 03/01/2012) 254438-25201-2012NE800086

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS
DE MANGUINHOS
EXTRATO DE REGISTRO DE PREÇOS

Ata de Registro de Preços nº 02/2012. Objeto: Registro de PVC Cristal 170 mm. Contratada: Ampar Plásticos Ltda. CNPJ: 12.531.670/0001-48. Item: 1 único item da licitação Vigência: 12 (doze) meses a partir da publicação no DOU. Modalidade de Licitação: Pregão Eletrônico nº 145/2011-FAR. Processo: 25387.000557/2011-10. Data da Assinatura: 02/01/2012. Valor Global: R\$ 48.930,00 (Quarenta e oito mil e novecentos e trinta reais). Rio de Janeiro, 02 de janeiro de 2012.

RESULTADOS DE JULGAMENTOS
PREGÃO Nº 127/2011

O Pregoeiro no uso das atribuições que lhe confiere a Portaria nº 041/2011-Far, faz saber que no dia seis de dezembro do ano de dois mil e onze, às dez horas, foi realizado a abertura do Pregão nº 127/2011-Far, tendo como vencedoras as empresas: Belbi Ind. e Confeções e Brindes Ltda, nos itens 02 e 05, no valor total de R\$ 39.300,00 (Trinta e nove mil e trezentos reais); GIGS Indústria Com. e Serv. Ltda, no item 12, no valor total de R\$ 18.000,00 (Dezoito mil reais); Mesquita e Cruz Ltda, nos itens 08, 09 e 11, no valor total de R\$ 57.300,00 (Cinquenta e sete mil e trezentos reais) e Anaruna Comércio e Serv. para Equip. Ltda, nos itens 01, 03, 04, 06, 07, 10, 13, 14 e 15, no valor total de R\$ 172.650,00 (Cento e setenta e dois mil e seiscentos e cinquenta reais). Valor Global do Pregão R\$ 287.250,00 (Duzentos e oitenta e sete mil e duzentos e cinquenta reais).

RAFAEL ROBERTO MENDES

(SIDEC - 03/01/2012) 254446-25201-2012NE800081

PREGÃO Nº 145/2011

O Pregoeiro no uso de suas atribuições que lhe confiere a Portaria nº41/FAR, faz saber que no dia 16/12/2011, foi realizado o Pregão Eletrônico nº145/2011, às 09:00, e foi declarada vencedora a empresa Apamar Plástico Ltda, no item 01 único item da licitação, no valor total de R\$48.930,00(Quarenta e oito mil e novecentos e trinta reais).

GILDADZO PEREIRA JUNIOR

(SIDEC - 03/01/2012) 254446-25201-2012NE800081

SERVIÇO DE COMPRAS
EXTRATO DE REGISTRO DE PREÇOS

Ata de Registro de Preços nº. 0191/2011. Objeto: Registro de Preços objetivando o serviço de produção do IFA - Insumo Farmacêutico Ativo - Haloperidol. Contratada: NORTEC QUIMICA S.A. CNPJ: 29.950.060/0001-57. Item: 01. Vigência: 12 (doze) meses a partir da publicação no DOU. Modalidade de Licitação: Pregão Eletrônico nº. 079/2011 - IPEC. Processo: 25387.000109/2011-41. Data da Assinatura: 26/12/2011. Valor Global: R\$ 200.179,50 (duzentos mil cento e setenta e nove reais e cinqüenta centavos). Rio de Janeiro, 03 de janeiro de 2012.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EXTRATO DE TERMO ADITIVO

Espécie: 3º Termo Aditivo ao Acordo de Cooperação Técnica nº 19/2009 entre FIOCRUZ, CNPJ 33.781.055/0001-35, Av. Brasil 4365, Mangueiras, RJ/RJ, CEP 21049-900, através do Instituto de Oswaldo Cruz - COC e a Companhia Estadual de Águas e Esgotos - CEDAE, CNPJ 33.352.394/0001-04, Rua Sacadura Cabral, nº 101 - RJ/RJ, CEP 20221-260. Finalidade: "Vigilância ambiental dos polímeros em apoio às atividades de erradicação global da poliomielite", vinculada ao Laboratório de Enterovírus FIOCRUZ do IOC. Assinatura: 17 de novembro de 2011. Vigência: 17/11/2011 a 02/10/2012. Signatários: Tânia Ceremomi de Araújo Jorge, CPF 403.241.337-15, Diretora do IOC/FIOCRUZ; Wagner Gracia Vieter, CPF 763.689.467-34, Diretor-Presidente da CEDAE; e Jorge Luis Ferreira Briard, CPF 771.854.127-49, Diretor de Produção e Grande Operação da CEDAE. Processo FIOCRUZ nº 25380.003142/2009-79.

Documento assinado digitalmente conforme MP nº 2.200-2 de 24/08/2001, que institui a Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileira - ICP-Brasil.