

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

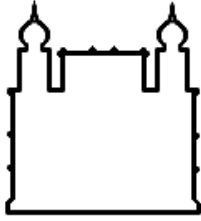
Mestrado no Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Medicina Tropical

**Sarampo na era de eliminação no Brasil: estudo de surtos recentes baseado no sequenciamento da região não codificante do genoma do vírus**

**Suelen Soares da Silva**

Rio de Janeiro

24 de julho de 2018



**Ministério as Saúde**  
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Medicina Tropical

Suelen Soares da Silva

**Sarampo na era de eliminação no Brasil: estudo de surtos recentes baseado no sequenciamento da região não codificante do genoma do vírus**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical

**Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Marilda Mendonça Agudo de Teixeira Siqueira**

Rio de Janeiro

24 de julho de 2018

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Soares da Silva, Suelen.

Sarampo na era de eliminação no Brasil: estudo de surtos recentes baseado no sequenciamento da região não codificante do genoma do vírus / Suelen Soares da Silva. – Rio de Janeiro, 2018.

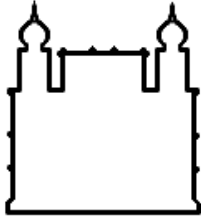
160 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em medicina Tropical, 2018.

Orientadora: Marilda Mendonça Agudo de Teixeira Siqueira.

Bibliografia: f. 129-145

1. Vírus do sarampo. 2. Epidemiologia molecular. 3. Filogenia.
4. Análise bayesiana. I. Título



**Ministério as Saúde**  
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-graduação em Medicina Tropical

Autora: Suelen Soares da Silva

**Sarampo na era de eliminação no Brasil: estudo de surtos recentes baseado no sequenciamento da região não codificante do genoma do vírus**

**ORIENTADORA:** Prof. Dr<sup>a</sup>. Marilda Mendonça Agudo de Teixeira Siqueira

Aprovada em: 24/07/2018.

**BANCA EXAMINADORA:**

**Prof. Dra.** Lívia Melo Villar (IOC/FIOCRUZ) **Presidente**

**Prof. Dra.** Dra Rita De Cássia Nasser Cubel Garcia (UFF)

**Prof. Dr.** Francisco Campello do Amaral Mello (IOC/FIOCRUZ)

**Prof. Dr.** Eduardo de Mello Volotão (IOC/FIOCRUZ)

**Prof. Dr** José Júnior França de Barros (IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 24 de julho de 2018

Dedico este trabalho às crianças. Principalmente às minhas crianças, Sophia e Stella, Milena, Ryan, Guilherme, Maria Eduarda, João Gabriel, Manu, Arthur e Isabele, meus tesouros, minha vida, alegria e razão do meu viver.

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Marilda Siqueira, minha chefe e orientadora, pela confiança e compreensão depositada ao longo desses anos. Pelas oportunidades de aprendizado e privilégio de estar com a melhor profissional da área de sarampo. Muito obrigada por ter me guiado com sabedoria e empenho durante a realização destes anos de trabalho.

Às minhas amigas, Jalusy e Xênia. Obrigada pelo companheirismo, carinho, amizade e apoio em todos esses anos.

Ao Dr David Brown por todo o “know how” sobre o sarampo.

À pesquisadora Paola Cristina Resende por todo empenho e ajuda para analisar os resultados do estudo.

À Dra. Maria de Lourdes Aguiar pela ajuda em diferentes níveis de conhecimento. Pelo carinho de sempre, conversas de assuntos profissionais e pessoais. Pela compreensão, carinho e valiosas sugestões e correções fundamentais na elaboração deste trabalho.

Ao Dr Alberto Severini, Helene Schultz e a todo grupo do Instituto Nacional de Microbiologia do Canadá.

Aos amigos Bráulia Caetano, Aline Matos, Cristiana Garcia e Jonathan Lopes pelo apoio, amizade, incentivo. Muito obrigada por toda ajuda.

Ao Dr. Fernando Motta pela amizade, disponibilidade, incentivo e auxílio imprescindível durante a realização deste trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo (LVRS), Priscila Born, Tania Andrade, Milene Miranda, Jaline Costa, pela amizade, apoio, estímulo, agradável convívio diário e pelos vários ensinamentos.

Às agências financiadoras CNPQ, Faperj e DECIT.

À equipe da Secretaria de Vigilância Epidemiológica (SMEV) e Coordenação Geral dos Laboratórios de saúde Pública (CGLAB) / Ministério da Saúde.

À Liana Lumi e Carlos Henrique Azeredo pela dedicação e trabalho durante o surto de Pernambuco e Ceará.

Aos funcionários dos LACENs e das Secretarias de Vigilância Epidemiológicas por participarem da rede de diagnóstico para as doenças exantemáticas.

Aos funcionários da Secretaria do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, Filipe Johann, Lindomberto Moreira, Michele Bentes e Maila Fernandes.

Aos colegas do Laboratório de Flavivírus.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical, em especial a Martha Suarez, pela oportunidade de aprendizado com a realização do presente Mestrado. E a todo corpo docente, pelos ensinamentos transmitidos durante o curso. Aos funcionários da Secretaria Acadêmica, sempre prestativos, pelo pronto atendimento em várias ocasiões e pelo carinho com o qual sempre fui recepcionada.

Aos membros da banca examinadora, Dra Rita De Cássia Nasser Cubel Garcia, Dra Livia Vilar, Dr Francisco Campello, Dr José Júnior e Dr Eduardo Volotão.

Ao André Fernandes e a toda família Belchior Coutinho.

Aos amigos da turma 2016 do Programa de Pós-Graduação Medicina Tropical.

Aos funcionários da biblioteca central de Manguinhos/ ICICT.

Agradeço especialmente, á minha mãe Luzia e a toda minha família pelo exemplo de amor. Aos meus irmãos Meri, Mary e Diego pelo cuidado, carinho e zelo. Ao Milton e a minha avó “torta” Ignez e às minhas filhas por renovarem as minhas energias e esperança todos os dias.

“Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano. Sempre que alguém descobre esse poder, algo antes considerado impossível, se torna realidade.”

Albert Einstein



**Sarampo na era de eliminação no Brasil: Estudo de surtos recentes baseado no sequenciamento da região não codificante do genoma do vírus**

**RESUMO**

O sarampo é uma virose imunoprevenível, altamente contagiosa e com elevada morbimortalidade. Em 2016, a Organização Mundial da Saúde declarou a eliminação de vírus do sarampo (MEV) na região das Américas. Entretanto, já que o vírus é endêmico em outras regiões, pode ser reintroduzido sob a forma de casos esporádicos, principalmente associado a viagens internacionais. O MEV pertence à família Paramyxoviridae, gênero *Morbillivirus* e encontra-se classificado em 24 genótipos e um sorotipo único. No Brasil, desde 2000 ocorrem casos importados de outros países. Em 2013, um surto se iniciou no nordeste do país, com grande número de casos. O objetivo deste estudo consistiu em investigar esse surto, ocorrido nos estados de Pernambuco (PE) e Ceará (CE) durante o período 2013-2015, sob a perspectiva virológica. As amostras clínicas e informações epidemiológicas foram coletadas pelas equipes de Vigilância Epidemiológica desses estados e encaminhadas para a confirmação do resultado e genotipagem no Laboratório de Referência Nacional (LVRS, IOC, Fiocruz). Após extração de RNA, o MEV foi detectado por RT-PCR em tempo real (protocolo CDC). Posteriormente, foi realizado RT-PCR convencional e sequenciamento do gene N (CDC/EUA; HPA/Inglaterra) e da região entre os genes M e F (RNC-M) das amostras positivas. No período avaliado, observamos a circulação de três genótipos virais no Brasil (B3, D4 e D8), sendo os dois primeiros associados a casos isolados. O genótipo D8, entretanto, foi introduzido no estado de PE e se disseminou para o estado do CE. Com base na análise bayesiana da região RNC-MF, duas linhagens do genótipo D8 circularam nos surtos. Enquanto em PE foi identificada a introdução de uma linhagem viral (2013-2014), no CE (2014-2015) co-circularam duas linhagens, sugerindo dois eventos de introdução. As análises moleculares demonstraram que a região RNC-MF viral constituiu um alvo adequado para o rastreamento de surtos dada a sua maior variabilidade, quando comparada ao gene N. Finalmente, ao analisarmos a relação entre os resultados sorológicos e de detecção molecular por RT-PCR, considerando o atual cenário epidemiológico e a alta cobertura vacinal da população brasileira, observamos que a exclusiva detecção de anticorpos IgM para a confirmação dos casos positivos de sarampo não constitui uma estratégia diagnóstica totalmente confiável no atual cenário epidemiológico, dada a divergência encontrada entre os resultados sorológicos e a detecção molecular MEV. Esse conjunto de informações é de fundamental relevância para subsidiar o programa de vigilância epidemiológica de sarampo, visando a adoção oportuna das medidas de controle e prevenção de novos casos.

Palavra chave: vírus do Sarampo, epidemiologia molecular, filogenia



**Measles in the era of elimination in Brazil: Study of recent outbreaks based on sequencing of the non-coding region of the virus genome**

**ABSTRACT**

Measles is an immunopreventable and highly contagious disease, causing relevant morbimortality. In 2016, the World Health Organization declared the elimination of measles virus (MeV) in the Americas. However, since the MeV is endemic in other regions, it can be reintroduced as sporadic cases, mainly associated with international travel. MeV belongs to the Paramyxoviridae family, genus *Morbillivirus* and is classified into 24 genotypes and a single serotype. Since 2000, imported measles cases have been reported in Brazil as in other countries. In 2013, however, an outbreak began in the northeast of the country, involving a large number of cases. The aim of this study was to investigate this outbreak, comprising Pernambuco (PE) and Ceara (CE) states along 2013-2015, under the virological perspective. Clinical samples and epidemiological information were collected by the Epidemiological Surveillance teams of these states and sent for genotyping and sequencing at the National Reference Laboratory (Respiratory Viruses and Measles Laboratory, IOC, Fiocruz). After RNA extraction, MeV was detected by real-time RT-PCR. Subsequently, conventional RT-PCR and sequencing of the N gene (CDC/US, HPA England) and of a region between the M and F genes (MF-UTR) were accomplished in positive samples. In the period evaluated, three viral genotypes circulated in Brazil - B3, D4 and D8 -, the first two associated with isolated cases. Genotype D8, however, was introduced in the state of PE in 2013 and was further disseminated to CE. Bayesian analysis of the MF-UTR region revealed that two strains of the D8 genotype circulated in the Northeast region. While in PE a single viral lineage (2013-2014) was identified related to strains from the United Kingdom, 2 lines co-circulated in CE (2014-2015), suggesting different introduction events. Molecular analyzes demonstrated that the viral MF-UTR region is an adequate target for outbreak tracking, given a higher variability, when compared to N gene. The results also reiterate the value of virological surveillance in addition to the classical epidemiological approaches for outbreak assessment. Finally, our results showed that exclusive detection of IgM antibodies for MeV case classification is not a reliable diagnostic strategy in the current epidemiological scenario, given the divergence found between the serological results and the molecular detection. Altogether, this information is pivotal to tailor and empower the measles epidemiological surveillance program for a timely intervention and prevention of new cases.

Keywords: Measles virus, molecular epidemiology, phylogenetics

## SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT .....	X
SUMÁRIO.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XIV
ÍNDICE DE TABELAS .....	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	XVIII
1. INTRODUÇÃO .....	21
1.1 HISTÓRICO DA DOENÇA .....	21
1.2 O VÍRUS DO SARAMPO .....	24
1.3 INFECÇÃO PELO VIRUS DO SARAMPO .....	30
1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E COMPLICAÇÕES .....	32
1.5 SARAMPO MODIFICADO E ATÍPICO .....	34
1.6 DIAGNÓSTICO .....	36
1.6.1 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	38
1.7 TRATAMENTO E CONTROLE .....	40
1.8 EPIDEMIOLOGIA DO SARAMPO.....	43
1.9 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR.....	46
1.10 DIFICULDADES PARA A MANUTENÇÃO DA ELIMINAÇÃO DO SARAMPO .....	51
1.11 ELIMINAÇÃO DO SARAMPO NAS AMÉRICAS .....	52
1.12 SARAMPO NO BRASIL .....	57
2. JUSTIFICATIVA .....	62
3. OBJETIVOS .....	64

3.1 OBJETIVO GERAL .....	64
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	64
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	65
4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	65
4.2 SELEÇÃO DE AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO DA REGIAO NÃO CODIFICANTE ENTRE OS GENE M E F .....	68
4.3 ETAPAS DO ESTUDO .....	69
4.4 SOROLOGIA.....	70
4.5 ENSAIOS MOLECULARES .....	73
4.5.1 EXTRAÇÃO DO RNA.....	73
4.5.2 RT-PCR EM TEMPO REAL .....	74
4.5.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE N POR RT-PCR CONVENCIONAL.....	76
4.5.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO RNC-MF POR RT-PCR.....	79
4.5.4 PROCEDIMENTOS PÓS-PCR .....	80
4.5.5 SEQUENCIAMENTO DE SANGER .....	80
4.5.6.ANÁLISE FILOGENÉTICA .....	82
4.5.7 ANÁLISE BAYESIANA DA REGIÃO NÃO CODIFICANTE ENTRE OS GENES M E F (GENOTIPO D8) .....	84
4.6 ASPECTOS ÉTICOS.....	88
5. RESULTADOS .....	89
5.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	89
5.2 SOROLOGIA.....	90
5.3 ANALISE COMPARATIVA ENTRE A DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM PARA O VIRUS DO SARAMPO E DETECÇÃO VIRAL POR PCR EM TEMPO REAL.....	91

5.4 DETECÇÃO VIRAL POR RT-PCR EM TEMPO REAL .....	91
5.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA REGIÃO C-TERMINAL DO GENE N .....	92
5.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA REGIÃO RNC-MF DO VIRUS DO SARAMPO PARA SUBSIDIAR ESTUDOS DE EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR .....	102
5.7 ANALISE BAYESIANA DA REGIÃO NÃO CODIFICANTE ENTRE OS GENE M E F DO VÍRUS DO SARAMPO .....	110
6. DISCUSSÃO .....	114
7. CONCLUSÃO.....	127
8. PERSPECTIVA.....	128
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	129
10. ANEXOS .....	146
10.1 APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	146
10.2 NÚMERO DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS BRASILEIRAS REPORTADAS NO MEANS E GENBANK.....	1501
10.3 SEQUÊNCIAS D8 CONSENSO REPRESENTATIVAS E SUAS SEQUÊNCIAS IDÊNTICAS REPRESENTADAS PARA OS 450 NUCLEOTÍDEOS DO GENE N.....	15657
10.4 RESUMO ENVIADO E ACEITO AO SIMPÓSIO DR HERMANN SCHATZMAYR 2017.....	15859
10.5 RESUMO ENVIADO, ACEITO E SELECIONADO PARA APRESENTAÇÃO ORAL PELO CONGRESSO DE VIROLOGIA 2017 .....	1590
10.6 TABELA FORNECIDA PELA SIEMENS/DADE BEHRING, ENZYGNOST ANTI-MEASLES VIRUS/IgG .....	161

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Eventos históricos para a eliminação do sarampo no mundo.....	23
<b>Figura 2:</b> Diagrama esquemático do vírus do sarampo. ....	24
<b>Figura 3:</b> Organização esquemática do genoma do vírus do sarampo.....	25
<b>Figura 4:</b> Organização genômica do Vírus do Sarampo.....	25
<b>Figura 5:</b> Variabilidade nucleotídica do genoma do vírus do sarampo. ....	30
<b>Figura 6:</b> Infecção e transmissão do vírus do sarampo.....	31
<b>Figura 7:</b> Sinais e sintomas manifestados na infecção pelo vírus do sarampo ....	33
<b>Figura 8:</b> Desenvolvimento e distribuição no corpo humano do exantema causado pela infecção pelo vírus do sarampo.....	33
<b>Figura 9:</b> Fluxograma utilizado pelo Ministério da saúde do Brasil para confirmação ou descarte do caso suspeito de sarampo.....	37
<b>Figura 10:</b> Marcadores biológicos da infecção pelo vírus do sarampo e utilidade dos ensaios de acordo com o início da erupção cutânea.....	39
<b>Figura 11:</b> Redução da mortalidade por sarampo, entre 1985 a 2012.....	41
<b>Figura 12:</b> Casos de sarampo reportados por região da OMS, 2000 a 2016.....	44
<b>Figura 13:</b> Incidência atual do sarampo e países com eliminação verificada.....	45
<b>Figura 14:</b> Componentes recomendados para a documentação da eliminação do sarampo.....	46
<b>Figura 15:</b> Ano da primeira e última detecção de genótipos de tipo selvagem do vírus do sarampo, 1970-2015.....	47
<b>Figura 16:</b> Distribuição global dos genótipos e incidência – 2018.....	49
<b>Figura 17:</b> Fonte de importações identificadas nos anos 2011 e 2012, dos vírus do sarampo na região das Américas.....	54
<b>Figura 18:</b> Genótipos de sarampo identificados na região das Américas no período de 2011 a semana epidemiológica 12 do ano 2014.....	55
<b>Figura 19:</b> Quadro com a declaração de eliminação do sarampo.....	56
<b>Figura 20:</b> Os 10 países com os maiores números de casos confirmados de sarampo.....	56
<b>Figura 21:</b> Distribuição de casos confirmados de sarampo na região das Americas – 2018.....	57
<b>Figura 22:</b> Estratégia de controle e incidência de 1968 a 2016.....	58
<b>Figura 23:</b> Casos de sarampo por município de residência, Brasil - 1998 e 2000.....	59
<b>Figura 24:</b> Casos confirmados e genótipos detectados no Brasil, 2000-2012.....	60
<b>Figura 25:</b> Distribuição dos casos reportados de sarampo de acordo com a classificação e semana epidemiológica em Roraima no início do surto em 2018.....	61

<b>Figura 26:</b> Quantitativo de amostras clínicas recebidas dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública dos estados de Pernambuco (PE) e Ceará (CE) para serem testadas por técnica sorológica e/ou por técnica de biologia molecular .....	66
<b>Figura 27:</b> Fluxograma das metodologias empregadas no estudo. ....	69
<b>Figura 28:</b> Fragmentos amplificados e sequenciados para a caracterização da região não codificante entre os genes M e F. ....	80
<b>Figura 29:</b> Figura esquemática dos resultados dos testes sorológicos para detecção de anticorpos IgM e IgG das amostras clínicas de soro coletados nos surtos de sarampo, ocorridos em Pernambuco e Ceará. Brasil, 2013-2015.....	90
<b>Figura 30:</b> Produtos da amplificação do gene N do vírus do sarampo, obtidos por reação de RT-PCR convencional e visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2%....	92
<b>Figura 31:</b> Amplificação do vírus do Sarampo por reação de RT-PCR convencional (protocolo CDC), segundo os valores de Ct obtidos por RT-PCR em tempo real.....	93
<b>Figura 32:</b> Reconstrução filogenética de 119 sequências do gene N do vírus do Sarampo (452nt), incluindo sequências circulantes no Brasil (2012-2015), sequências de referência da OMS e sequências representativas de outros países.....	94
<b>Figura 33:</b> Distribuição dos casos esporádicos e surtos detectados nos estados brasileiros de acordo com os genótipos identificados pelos anos. ....	96
<b>Figura 34:</b> Gel de agarose a 2%, após eletroforese mostrando o padrão de amplificação do produto da reação de RT-PCR dos 6 fragmentos do protocolo da região não codificante entre os genes M e F .....	105
<b>Figura 35:</b> Reconstrução filogenética com 114 sequências do gene N (503 nt) do vírus do sarampo circulante durante os surtos e caso esporádico (São Paulo - SP) ocorridos no Brasil (2013-2015), com sequências representativas de outras regiões geográficas obtidas no GenBank. ....	106
<b>Figura 36:</b> Reconstrução filogenética da região não codificante entre os genes M e F (1172nt) do vírus do sarampo, circulante durante os surtos nos estados de Pernambuco e Ceará, Brasil (2013-2015). A análise incluiu 114 sequências brasileiras e representativas de outras regiões geográficas.....	107
<b>Figura 37:</b> Análise de estrutura temporal da região não codificante entre os genes M e F do vírus do sarampo, em sequências dos surtos de Pernambuco e Ceará (2013-2015). ....	110
<b>Figura 38:</b> Árvore de máxima credibilidade da região não codificante entre os genes M e F do vírus do sarampo, genótipo D8. ....	113

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Cepas nomeadas do genótipo D8 identificadas pela base de dados da rede global de sarampo (MeaNS). .....	48
<b>Tabela 2:</b> Amostras clínicas de casos suspeitos de sarampo, coletadas no surto do Ceará (CE) e Pernambuco (PE) encaminhadas ao Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, segundo o tipo de amostra, estado de origem e ano. Brasil, 2013-2015. ....	66
<b>Tabela 3:</b> Quantitativo das sequências dos casos esporádicos utilizadas para a análise filogenética, Brasil, 2012-2015. ....	67
<b>Tabela 4:</b> Métodos utilizados no Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo nos casos suspeitos de CE e PE 2013-2015. ....	70
<b>Tabela 5:</b> Sequência dos iniciadores e sondas específicos para o gene N e gene da RNase P humana da reação de PCR em tempo real para detecção do sarampo .....	74
<b>Tabela 6:</b> Protocolo para a reação de qRT-PCR para detecção do gene N do vírus do sarampo (Hummel et al., 2006). ....	75
<b>Tabela 7:</b> Interpretação dos valores do Ct da reação de qRT-PCR para detecção do gene N do vírus do sarampo. ....	75
<b>Tabela 8:</b> Iniciadores empregados em dois diferentes protocolos de PCR para a amplificação do gene N do vírus do sarampo, .....	77
<b>Tabela 9:</b> Reação de RT-PCR convencional de passo único para amplificação da região C-terminal do gene N do vírus do sarampo. ....	77
<b>Tabela 10:</b> Protocolo para reação de transcrição reversa com a enzima MMLV. ....	78
<b>Tabela 11:</b> Protocolo para amplificação da região C-terminal do gene N do vírus do sarampo. ....	78
<b>Tabela 12:</b> Iniciadores empregados para a amplificação e sequenciamento da região não codificante entre os genes M e F do vírus do sarampo. ....	79
<b>Tabela 13:</b> Sequências de referência dos genótipos do sarampo da Organização Mundial da Saúde (OMS). ....	85
<b>Tabela 14:</b> Número de acesso e cepas de vírus do sarampo D8 disponíveis no GenBank utilizadas na construção do conjunto de dados para as análises filogenéticas. ....	86
<b>Tabela 15:</b> Resultados de detecção de IgM e detecção viral das amostras recebidas para as técnicas de sorologia e reação em cadeia da polimerase em tempo real. ....	91
<b>Tabela 16:</b> Detecção do vírus do sarampo por reação em cadeia da polimerase em tempo real das amostras clínicas de secreção nasofaríngea e urina coletadas nos surtos de sarampo, ocorridos em Pernambuco e Ceará. Brasil, 2013-2015. ....	91



<b>Tabela 17:</b> Substituição de aminoácidos da sequência do gene N do vírus do sarampo do caso esporádico detectado em São Paulo (2013), em relação a cepa de referência D4 da OMS (MVi/Montreal.CAN/89) .....	97
<b>Tabela 18:</b> Substituições de aminoácidos das sequências do gene N do vírus do sarampo dos casos esporádicos detectados no Brasil, 2013-2014, em relação a cepa de referência B3 da OMS (MVi/ Mvi/Ibadan.NIE/97/1). .....	98
<b>Tabela 19:</b> Substituições de nucleotídeos das sequências do gene N do vírus do sarampo das amostras brasileiras do genótipo D8 dos surtos de Pernambuco e Ceará e dos casos esporádicos, 2012-2015, em comparação com a cepa de referência da Organização Mundial da Saúde (MVi/Manchester.GBR/30.94) e cepas nomeadas definidas na base de dados da rede global do sarampo (MeaNS) .....	100
<b>Tabela 20:</b> Substituições de aminoácidos das sequências do gene N do vírus do sarampo das amostras dos surtos e casos esporádicos detectados no Brasil, 2012-2015, em relação a cepa de referência D8 da Organização Mundial da Saúde (MVi/Manchester/30.94).....	101
<b>Tabela 21:</b> Substituições de nucleotídeos na região não codificante entre os genes M e F do vírus do sarampo, identificadas em sequências obtidas nos surtos de Pernambuco (PE) e Ceará (CE) (2013-2015), .....	108
<b>Tabela 22:</b> Estimativa do ancestral comum mais recente (tMRCA) dos grupos genéticos das linhagens 1 e 2 (L1 e L2) das cepas brasileiras (BRA) e cepas internacionais referentes a análise bayesiana .....	112

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg - Micrograma

µL - Microlitro

Aa - Aminoácidos

APME - Encefalomielite Pós-infecciosa Aguda

AVE - Tampão de eluição

CD46 - *Membrana cofactor protein-MCP*

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças americano

cDNA - Ácido nucleico complementar

CE - Ceará

CF - Fixação de complemento

CGLAB - Coordenação Geral dos Laboratórios

Ct – *Threshold cycle*

DF - Distrito Federal

DNA - Ácido desoxiribonucleico

EIE - Ensaio Imunoenzimático

ELISA - *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*

ES - Espírito Santo

EPI - Programa Ampliado de Imunizações

ESS - *Effective Sample Size*

EUA - Estados Unidos da América

F - Proteína de Fusão

GRB – Grã Bretanha

H - Proteína Hemaglutinina

HI - Inibição da hemaglutina

HLI - Inibição da hemolisina

HPD – *Highest posterior density*

HPE – *Health Public England*

Ig - Imunoglobulina

L - Proteína Grande

LVRS - Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo

LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública

M - Proteína da Matriz  
MCC – *Maximun Clade Credibility*  
MCMC – *Markov Chain Monte Carlo*  
MEANS - *Global Measles Nucleotide Surveillance Database*  
MeV - *Measles Vírus*  
MVi – *Measles Virus isolated*  
MMeV – *Measles Virus Sample*  
MIBE - *Measles inclusion body encephalitis*  
MMLV - *Myeloblastosis vírus reverse transcriptase*  
MG - Minas Gerais  
M/R LabNet - Rede de laboratórios Mundiais de sarampo e rubéola  
MS - Ministério da Saúde  
N - Nucleoproteína  
nt - Nucleotídeos  
NTC – *No template control*  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde  
P - Fosfoproteína  
PB - Paraíba  
pb - Pares de bases  
PCR - Reação em cadeia da polimerase  
PE - Pernambuco  
PME - Encefalite Primária  
POD - Peroxidase  
POP - Procedimento Operacional Padrão  
pp – *posterior probability*  
PRNT - Neutralização por redução de placa  
qRT-PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real  
RJ - Rio de Janeiro  
RNC-MF - Região não codificante entre os genes M e F  
RR - Roraima  
SC - Santa Catarina  
SLAM - *Signalling lymphocytic activating molecule*

SNC - Sistema Nervoso Central

SNF - Secreção Nasofaringea

RNA - Ácido ribonucléico

RNA<sub>m</sub> - Ácido ribonucleico mensageiro

RT - Transcrição Reversa

SP - São Paulo

SS - Sequenciamento

SSPE - Panencefalite Esclerosante Subaguda

SMEV - Secretaria de Vigilância Epidemiológica

tMRCA – *The most recente common ancestor*

UV - Luz ultravioleta

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 HISTÓRICO DA DOENÇA

O sarampo é uma doença aguda viral, altamente contagiosa e de transmissão respiratória. Embora a maioria dos casos tenha evolução favorável, a doença pode ser grave e atualmente ainda causa aproximadamente 100.000 mortes anuais aonde tem baixa cobertura vacinal (Goodson e Seward, 2015).

As epidemias de doenças exantemáticas estiveram associadas a diminuições abruptas no tamanho da população sendo registradas na China, na Índia e na região do Mediterrâneo. Com as migrações humanas para diferentes regiões geográficas, entre os séculos XVII e XIX, a disseminação do Vírus do Sarampo (MEV) causou epidemias devastadoras e despovoamento no mundo (Babbott e Gordon, 1954). Durante muitos anos o sarampo foi considerado uma forma menos grave da varíola. No século X, Abu Becr, físico e médico persa conhecido como Rhazes, citou pela primeira vez na literatura médica sobre o sarampo tentando diferir a doença da varíola (Coura, 2013).

O sarampo foi relatado pela primeira vez nos Estados Unidos por John Hull em 1657 na cidade de Boston, onde causou epidemias severas e periódicas, resultando em doenças e morte substanciais. Foi somente no ano 1670 que Thomas Sydenham, ao descrever uma epidemia em Londres, propôs o quadro clínico e as complicações respiratórias causados pelo MEV, distinguindo o mesmo da varíola (Coura, 2013).

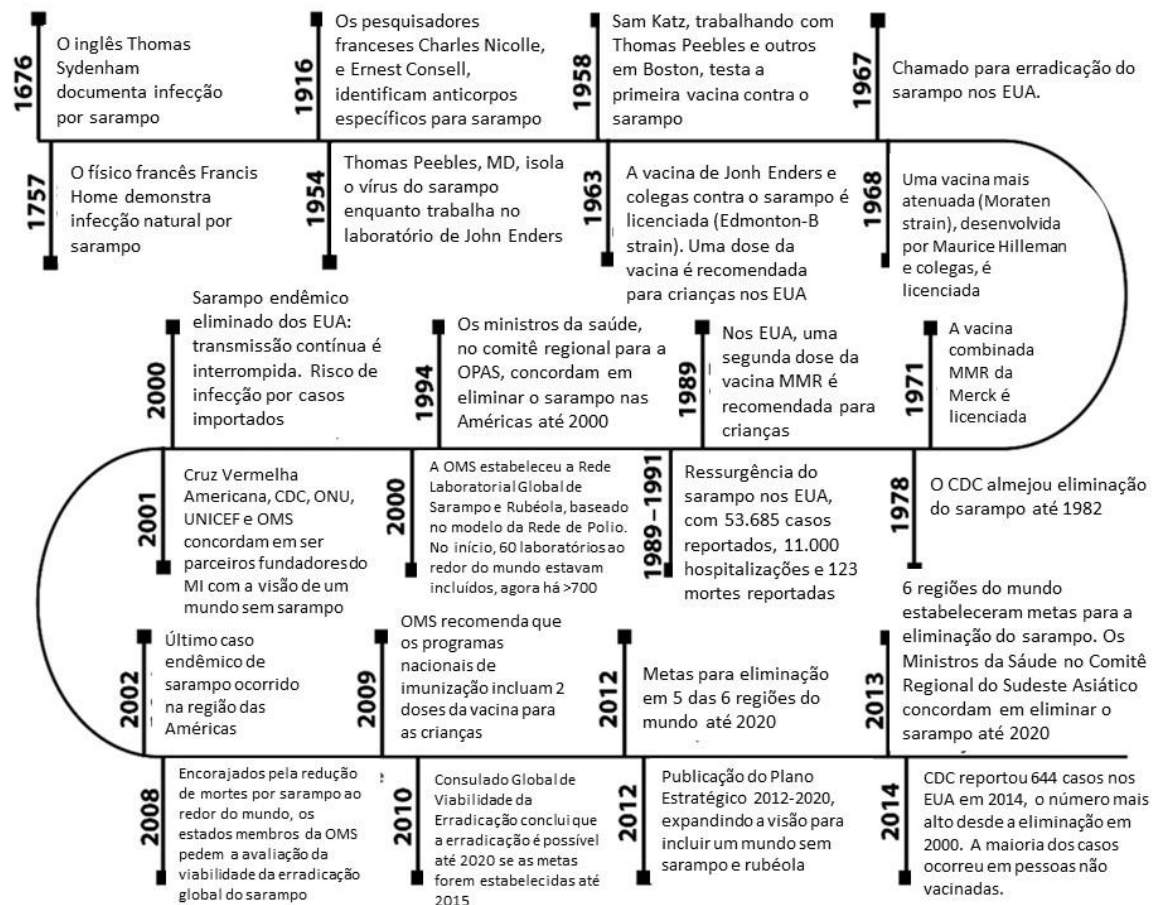
Em 1757, o médico escocês Francis Home, em uma tentativa de imunização, induziu o desenvolvimento de sinais de sarampo em indivíduos saudáveis usando o sangue de outros pacientes com sintomas da doença, demonstrando que a mesma era causada por um agente infeccioso (M&Ri, 2017).

A comprovação da natureza altamente contagiosa do sarampo, definição de sua forma de transmissão, tempo de incubação, bem como, a descrição da imunidade duradoura pós-infecção, foram estabelecidos em um estudo clássico de Panum, em 1846, com os habitantes das remotas ilhas Faroe. Neste estudo foi observado que o sarampo ficou ausente por alguns anos naquelas ilhas e ao

ser reintroduzido causou doença apenas em jovens que mantiveram contatos entre si (Castro-Silva, 2002; Coura, 2013).

Em 1875, uma epidemia nas Ilhas Fiji foi responsável por quase 20.000 mortes, com taxa de mortalidade de 26%. Registros de 1878-1879 referentes à tribos nativas americanas sugeriram que estas foram afetadas pela doença e tiveram alto índice de mortalidade. Esses exemplos históricos ilustram a mortalidade extremamente alta associada à introdução do MEV em populações nativas não imunes (M&Ri, 2017).

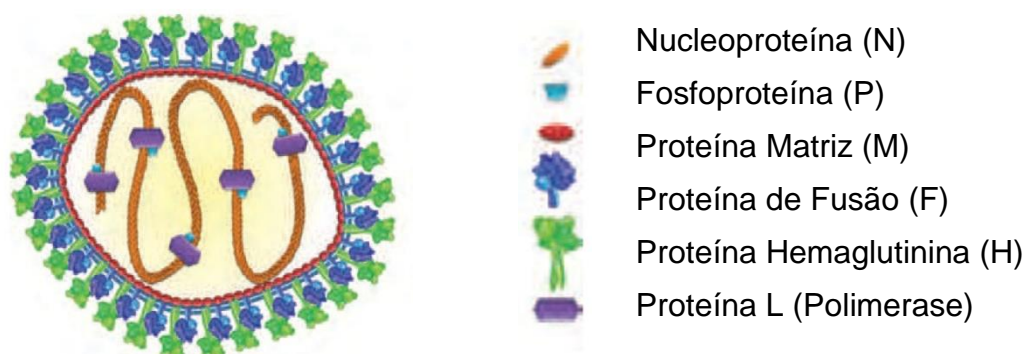
Os pesquisadores franceses Charles Nicolle e Ernest Conseil, em 1916, identificaram anticorpos protetores específicos para o sarampo no sangue de pacientes e demonstraram que o soro de pessoas previamente afetadas poderia ser usado para proteger contra a doença (M&Ri, 2017). Em 1954, Enders e Peebles cultivaram o vírus em células “in vitro” a partir do sangue de uma criança infectada e, nos anos seguintes, o vírus foi adaptado para diferentes linhagens celulares. Em 1958 Katz e o seu grupo adaptaram o vírus em células de embrião de galinha e realizaram os primeiros testes da vacina contra o sarampo na cidade de Boston (Enders *et al.*, 1960). O desenvolvimento de vacinas de vírus vivo e atenuado em cultura de célula de galinha foi o passo inicial para o programa de erradicação do sarampo (Figura 1).



**Figura 1:** *Eventos históricos para a eliminação do sarampo no mundo.* Adaptado de Goodson *et al* (Goodson e Seward, 2015). CDC, Centro de Controle e Prevenção de Doenças; M & RI, Iniciativa Contra o Sarampo e Rubéola ; MI, Iniciativa Contra o Sarampo; MMR, vacina contra sarampo-caxumba-rubéola; OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde; ONU, Organização das Nações Unidas; UNICEF, Fundo das Nações Unidas para a Infância.

## 1.2 O VÍRUS DO SARAMPO

O Vírus do Sarampo (MEV) pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae* e classificado no gênero *Morbillivirus*. Por não apresentar atividade neuraminidásica, difere do gênero *Paramyxovirirus* (ICTV, 2017). Os virions são esféricos, com diâmetro variando de 100 a 250nm e são constituídos de capsídeo de simetria helicoidal, pleomórfico, envolto em envelope lipídico derivado da célula hospedeira. Os componentes estruturais do envelope viral são a proteína hemaglutinina (H), a proteína de fusão (F) e a proteína matriz (M). Na superfície interna do envelope do vírus localiza-se a proteína da matriz e, da face externa do envelope, originam-se projeções de 9 a 15nm compostas pela hemaglutinina e a proteína de fusão. Outras três proteínas estruturais estão contidas no nucleocápsideo, interagindo com o genoma viral: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) e proteína grande - polimerase (L), a qual tem função de RNA polimerase dependente de RNA (Lund *et al.*, 1984) (Figura 2).

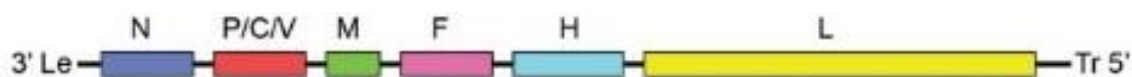


**Figura 2:** Diagrama esquemático do Vírus do Sarampo. A bicamada lipídica da partícula pleomórfica está representada com uma linha azul. A abaixo dela, localiza-se a proteína matriz em vermelho. A membrana viral é envelopada com complexos de glicoproteína com trímeros de proteína de fusão (em azul escuro) e tetrâmeros de proteína hemaglutinina (em verde). O genoma de RNA de cadeia negativa e a nucleoproteína (laranja) formam o nucleocapsídeo, que interage com a fosfoproteína (azul claro) e a polimerase (roxa). Adaptado de Griffin et al 2013 (Griffin, 2013)

O MEV possui genoma de RNA de fita simples linear com 15.894 nucleotídeos (nt), não segmentado, de orientação negativa. O genoma do vírus possui 6 unidades de transcrição, as quais codificam oito proteínas, sendo seis estruturais (N, P, M, F, H, L) e duas não estruturais C e V. (Rota *et al.*, 2016b) .

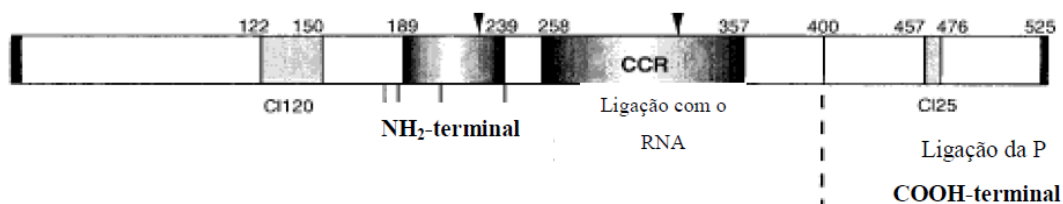


As unidades transcricionais são separadas entre si por uma região intergênica que apresenta a sequência consenso 3'-GAA-5' (exceto a região intergênica entre H e L, cuja sequência é 3'-GCA-5'). Essa sequência é precedida pelo sinal de poliadenilação do gene anterior e seguida do sinal de iniciação de transcrição do gene subsequente. A síntese das proteínas virais se dá numa ordem específica, N → P/C/V/R → M → F → H → L de acordo com a posição do gene no genoma (Griffin, 2013) (figura 3).



**Figura 3:** Organização esquemática do genoma do vírus do sarampo. Os retângulos coloridos representam a região codificadora e as linhas pretas representam as regiões não codificadoras (Cox e Plemper, 2015). Duas proteínas não estruturais (C e V) e 6 proteínas estruturais (nucleoproteína (N), fosfoproteína (F), proteína da matrix (M), proteína de fusão (F), hemaglutinina (H) e proteína grande (L).

O primeiro RNAm transcrito tem 1.683nt e codifica a nucleoproteína (N) de 525 aminoácidos (aa). Essa proteína é a mais abundante do MEV e se liga ao RNA viral, formando o nucleocapsídeo, que unindo-se com as proteínas P e L forma o complexo de ribonucleoproteína (RNP) servindo como um arcabouço para a transcrição, replicação e empacotamento da progênie viral (Lund *et al.*, 1984; Sedlmeier e Neubert, 1998). A nucleoproteína é dividida em duas regiões funcionalmente distintas: amino-terminal (n-terminal, 1-400 aa) e carboxi-terminal (c-terminal, 401-525 aa) (Figura 4).



**Figura 4:** Organização estrutural e funcional da nucleoproteína (N) do Vírus do Sarampo. A Nucleoproteína é dividida em duas regiões: n-terminal (1-400 aa) e c-terminal (401-525 aa). Estão indicadas as regiões de ligação com a fosfoproteína e o RNA. Adaptado de Karlin D *et al.*, 2002 (Karlin *et al.*, 2002).

A n-terminal é uma região conservada que interage com o RNA (Myers *et al.*, 1997; Kouznetzoff *et al.*, 1998; Myers *et al.*, 1999). A região c-terminal é hipervariável e contém um dos sítios de ligação com a proteína P. O resíduo N522 está relacionado com a interação com o hsp72 (do inglês “heat shock protein”, proteína de choque térmico) que promove a síntese de RNA e propagação do MEV (Zhang e Oglesbee, 2003). A análise da sequência de nucleotídeos que codifica a região c-terminal da nucleoproteína tem sido útil na epidemiologia e na identificação de genótipos virais. Estudos mostram que a porção do gene entre os nt 1216 e nt 1625 é a região com maior variação entre as cepas de sarampo (Rota *et al.*, 2009; Bankamp *et al.*, 2013; Griffin, 2013). A variabilidade genética da nucleoproteína não parece afetar significativamente a patogenicidade do vírus e ainda não foi estabelecida uma associação entre genótipos e diferenças na gravidade das manifestações clínicas (Shannon M. Beaty, 2016).

A próxima unidade de transcrição expressa no ciclo viral tem 1648 nt e gera 3 produtos: a fosfoproteína e as proteínas não-estruturais, C e V. Esses produtos são codificados pelo mesmo RNAm, mas traduzidos a partir de fases de leitura diferentes. O códon AUG para iniciação da tradução do gene C localiza-se a 19 nucleotídeos abaixo daquele que inicia a síntese da fosfoproteína (Bellini *et al.*, 1985). Esta proteína é um cofator da polimerase ativado por fosforilação e se liga as nucleoproteínas, proteína L e ao RNA para formar o complexo helicase. A região n-terminal da fosfoproteína é acídica, altamente fosforilada e liga-se à proteína L estabilizando-a, enquanto a região c-terminal contém o domínio que se liga a nucleoproteína (Bellini *et al.*, 1985; Bourhis *et al.*, 2006).

Duas funções foram descritas para a proteína C referente a infecciosidade viral: a regulação da síntese de RNA (Reutter *et al.*, 2001) e redução da capacidade da célula em responder à sinalização do interferon  $\alpha/\beta$ , prevenindo o estabelecimento do estado antiviral (Shaffer *et al.*, 2003).

A proteína acessória V é codificada na mesma unidade de transcrição dos genes P/C, porém, seu RNAm difere do transcrito do gene P pela inserção de um resíduo extra de guanosina na posição 751. Essa inserção muda a fase de leitura do RNAm fazendo com que a extremidade c-terminal da proteína V se

torne rica em cisteína, sendo fosforilada e distribuída de maneira difusa no citoplasma de células infectadas (Griffin, 2013) exercendo papel de balanceamento da acumulação de produtos virais. Em cultura celular, a expressão da proteína V levou a distribuição da nucleoproteína (Kato *et al.*, 1997). Esta proteína, assim como a C, são essenciais para a virulência, modulam os mecanismos de defesa do hospedeiro, em particular as respostas ao interferon, e também regulam a expressão gênica (Palosaari *et al.*, 2003).

A proteína da matriz (M) é uma proteína básica de 335 aa, com várias regiões hidrofóbicas não polares conservadas. Interage com lipídeos da membrana celular e tem como função principal dirigir a montagem e o brotamento do vírus (Griffin, 2013). A proteína M interage com o nucleocapsídeo durante a fase de maturação do vírus. Quando ela se liga ao complexo de RNP viral, observa-se uma pronunciada inibição da transcrição, o que indica um papel regulatório desta proteína (Suryanarayana *et al.*, 1994). A capacidade de se ligar ao nucleocapsídeo e inibir a transcrição é frequentemente defeituosa nas proteínas M de vírus que causam infecções persistentes. Isso pode ser resultado de hipermutações nesta proteína, detectadas durante infecções persistentes. Correlações entre defeitos da proteína M e deficiências da montagem do vírus foram feitas com isolados alterados de MEV, obtidos de pacientes com panencefalite esclerosante subaguda (SSPE) (Hirano *et al.*, 1993; Harrison *et al.*, 2010).

A proteína de fusão (F) é uma glicoproteína transmembrana conservada de 553 aa, cuja função é promover a fusão do envelope viral à membrana da célula hospedeira e penetração do nucleocapsídeo viral no citoplasma da célula. A proteína F é sintetizada como precursor inativo F0 que, após glicosilação no retículo endoplasmático, é transportado para o Golgi, onde sofre clivagem mediada por furinas. O resultado desse processo é a geração de duas subunidades (F1 e F2) que permanecem ligadas por pontes dissulfídicas. A glicoproteína F precisa interagir com a glicoproteína H para formar um complexo de fusão ativo. Isso porque a ligação da proteína H aos receptores celulares provavelmente induz uma alteração estrutural em F, ativando o processo de fusão (Wild *et al.*, 1991; Jardetzky e Lamb, 2014).

A hemaglutinina (H) é uma glicoproteína transmembrana tipo II de 617 aa. Sua porção n-terminal fica no interior do nucleocapsídeo, enquanto que a extremidade c-terminal fica voltada para o exterior do vírus. Essa proteína se projeta da superfície viral em uma estrutura em forma de haste (*stalk*) que termina em uma grande cabeça globular, formada por seis lâminas  $\beta$  (Navaratnarajah *et al.*, 2011). Ela se organiza em tetrâmeros e media a ligação do vírus a célula hospedeira, por meio de interação de resíduos de aa da cabeça globular com a molécula sinalizadora de ativação de linfócitos (SLAM, do inglês “signalling lymphocyte activation molecule”, ou CD150), expressa em células imunes, ou com a nectina-4, expressa em células epiteliais (Griffin, 2013). A cepa viral Edmonston e as cepas vacinais utilizam como receptor a molécula CD46 humana que é expressa em todas as células nucleadas (Rota *et al.*, 2016b). O domínio globular da proteína H contém o epítipo HNE, que é o principal alvo do sistema imune do hospedeiro. Os anticorpos direcionados contra a proteína H têm atividade neutralizantes sobre o vírus (Hu e Norrby, 1994). Pequenas modificações de aminoácidos em HNE são suficientes para reduzir a atividade da proteína H e afetar replicação viral, de forma que aquele epítipo é bastante conservado entre as diversas linhagens do MEV. Essa característica confere estabilidade antigênica ao vírus, o que facilitou o desenvolvimento de uma vacina contra a doença (Tahara *et al.*, 2016).

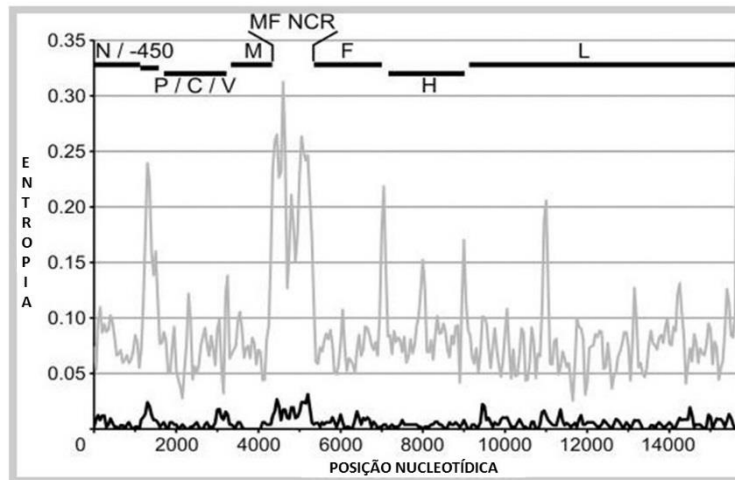
A proteína L é maior proteína do MEV com 2.181 aa. Compõe, juntamente com a proteína P, o complexo RNA polimerase viral. A proteína L tem a função de polimerase propriamente dita e realiza tanto a transcrição quanto a replicação do genoma viral (Bankamp *et al.*, 2002; Cox e Plemper, 2015).

O MEV é considerado conservado e geneticamente estável, diferentemente de outros vírus de RNA dentro da mesma ordem. Estudos revelaram níveis baixos de variação tanto antigênica quanto genética (Rota *et al.*, 1992), e mostraram que a infecção natural e a vacinação conferem imunidade ao longo da vida. A capacidade de neutralização do vírus por anticorpos monoclonais específicos para a proteína H tem sido mantida há décadas com eficácia variável (Klinge *et al.*, 2000).

Dentre os genes do sarampo, os que apresentam maior nível de variabilidade são os que codificam as proteínas N e H. No caso da proteína N,

por exemplo, a variabilidade se concentra na região que codifica a porção c-terminal da proteína, e pode chegar a 12% entre amostras de vírus selvagens. Outros genes, como L, M e F apresentam menor variabilidade, em torno de 7 a 10%. Dessa forma, classicamente, a caracterização genética das linhagens do MEV empregada para vigilância se baseia no sequenciamento dos genes N e/ou H (Rima *et al.*, 1997; Bankamp *et al.*, 1999). No entanto, uma maior quantidade de informações sobre a variabilidade do gene H e da região intergênica entre os genes M e F vem sendo revelada, e estas duas regiões do genoma têm sido apontadas como alvos importantes para análises em estudos epidemiológicos (Harvala *et al.*, 2016; OMS, 2018c).

Aproximadamente 11% do genoma do MEV corresponde a regiões não codificantes (RNC). Nessa porção do genoma foram identificadas sequências de ação *cis* que têm papéis na replicação e empacotamento do genoma, bem como na síntese, processamento e tradução dos RNAm. Mutações nessas regiões do genoma podem alterar a expressão das proteínas, afetando a iniciação da transcrição, a eficiência da tradução ou a estabilidade do RNAm (Heider *et al.*, 1997). Dentre as regiões não codificantes, a região entre os genes M e F (RNC-MF) é a mais extensa (1.018 nt) e apresenta maior nível de variabilidade, como pode ser observado na figura 5, onde a diversidade nucleotídica do genoma do MEV está ilustrada. Outra característica desta região é o seu alto conteúdo GC. Experimentos com MEVs recombinantes e transcritos de plasmídeos indicaram que a RNC-MF modula a produção das proteínas F e M. Foi demonstrado que vírus com deleções nessa região apresentam reduzida transcrição da proteína F. Esta região vem sendo sugerida como um alvo para estudos epidemiológicos para identificação de linhagens dentro de um mesmo ou diferentes genótipos, uma vez que é uma região altamente variável e susceptível a mutações (Rota *et al.*, 2016a).

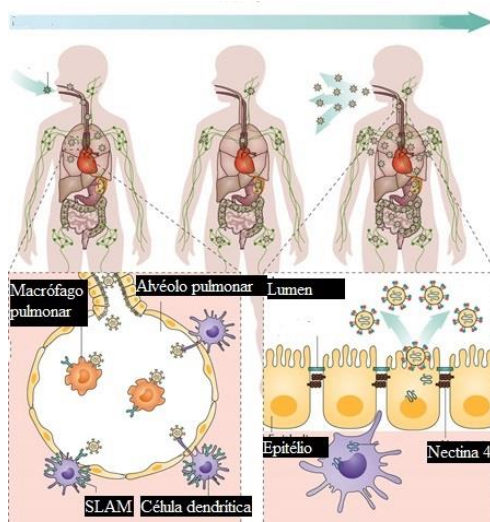


**Figura 5:** Variabilidade nucleotídica do genoma do vírus do sarampo. Adaptado de Penedos *et al* (Penedos *et al.*, 2015). Nucleoproteína (N), fosfoproteína (F), proteínas não estruturais (C e V), proteína da matrix (M), região não codificante entre os genes M e F (MF NCR), proteína de fusão (F), hemaglutinina (H) e proteína grande (L).

### 1.3 INFECÇÃO PELO VIRUS DO SARAMPO

A transmissão do MEV ocorre por vias aéreas por contato de secreções respiratórias de pessoas infectadas. Os MEV infectantes na secreção são adsorvidos às células do hospedeiro mediada pela hemaglutinina. Após a adsorção, as proteínas de fusão e a hemaglutinina medeiam a entrada do vírus na célula pelo receptor específico. O primeiro receptor descrito na literatura foi o CD46, uma glicoproteína transmembranar que pertence à família dos reguladores de ativação do complemento e é expresso em células humanas nucleadas (Griffin, 1995). Após sua descoberta, tornou-se evidente que somente a vacina e as linhagens do MEV adaptadas em laboratório poderiam utilizar o CD46 como receptor. A molécula sinalizadora de ativação de linfócitos (SLAM ou CD150) também foi identificada como sendo um receptor celular para MEV do tipo selvagem que funciona como um receptor comum conferindo além da absorção do vírus, a formação de sincício em várias estirpes do MEV. O CD150 é expresso principalmente em subconjuntos de linfócitos e células dendríticas, células de Langerhans ativadas, macrófagos, em células B ativadas, células T de memória e ativadas, incluindo células T regulatórias ativadas e tímócitos imaturo (Aversa *et al.*, 1997).

Acriticava-se que o sítio primário da infecção era o epitélio do trato respiratório superior ou conjuntiva dos indivíduos susceptíveis, onde ocorreria a replicação primária do vírus. Porém foi demonstrado que nos tecidos epiteliais os receptores nectina 4 estão localizados no lado basolateral e não na superfície apical das células epiteliais (figura 6). Sendo pouco provável que as células epiteliais sejam os alvos iniciais da infecção, além dos antígenos para o MEV não ser detectados nesses tecidos (Noyce *et al.*, 2011).



**Figura 6:** Infecção e transmissão do vírus do sarampo. Adaptado de Rota *et al* 2016 (Rota *et al.*, 2016a). O Vírus do sarampo (MEV) aspirado para o trato respiratório infecta macrófagos alveolares ou células dendríticas (DC's) usando a molécula de ativação linfocítica de sinalização (SLAM ou CD150) como um receptor. A infecção pelo MEV é amplificada nos tecidos linfoides regionais, seguida por uma infecção sistêmica. Os linfócitos e DC's infectados pelo MEV migram para a camada celular subepitelial e transmitem o MEV para as células epiteliais de vários órgãos, utilizando a nectina 4 como um receptor.

O MEV entra por via respiratória, em seguida, infecta as células dendríticas, macrófagos e linfócitos no epitélio respiratório, mediado pelo receptor SLAM. O MEV é transportado para os linfonodos, seguido por uma viremia associada às células que distribui a infecção para outros órgãos. Os linfócitos e as células dendríticas são os principais alvos do MEV devido ao receptor CD150 (SLAM). Os vírus migram provavelmente por intermédio dos macrófagos pulmonares e células dendríticas mediada pelo receptor SLAM para os gânglios linfáticos regionais, levando a disseminação sistêmica do vírus (Griffin *et al.*, 1994). Ao atingir as células linforreticulares do baço, fígado, medula óssea, placas de Peyer e outros órgãos linfóides tornam-se os sítios de replicação viral. Após 5 a 7 dias, o vírus é levado pela circulação sanguínea no

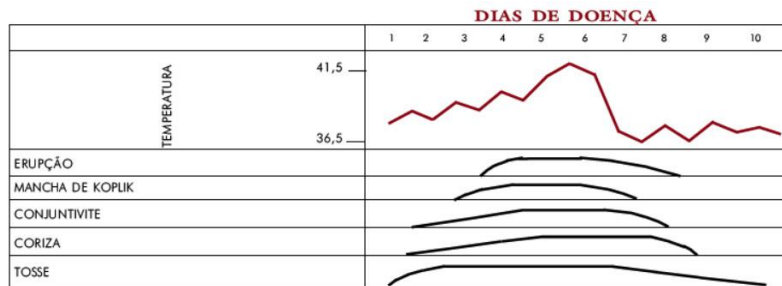
interior dos linfócitos e monócitos, iniciando infecção generalizada do endotélio vascular que precede infecção nos tecidos gastrointestinais, conjuntiva, trato respiratório e cavidade bucal (viremia secundária) (Robbins, 1962). Nesse período ocorre o aparecimento do exantema. O período mais infeccioso é considerado 4 dias antes e 4 dias após o início da erupção cutânea, quando os níveis do MEV no trato respiratório estão mais altos (Rall, 2003; Rota *et al.*, 2016a).

Alterações patognomônicas ocasionadas pela infecção pelo MEV foram descritas e podem ser observados no decorrer da infecção, como manchas de koplik (pequenas lesões brancas) que se tornam visíveis na mucosa bucal após 11 dias de infecção (Baxby, 1997) e o desenvolvimento de células gigantes multinucleadas que ocorre com a fusão de células infectadas com células vizinhas não infectadas nos tecidos linfóides e inclusões intranucleares nas células epiteliais (Castro-Silva, 2002).

#### **1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E COMPLICAÇÕES**

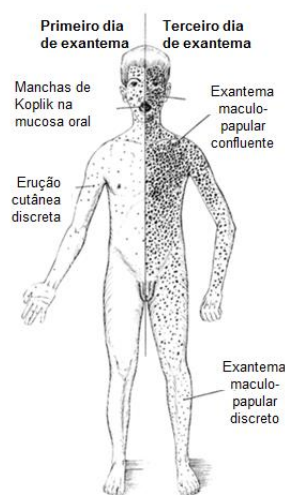
As características clínicas clássicas de sarampo são febre, exantema maculopapular eritematoso (não vesiculosa), tosse, coriza, conjuntivite e manchas de Koplik. Após o período de incubação do vírus no organismo do indivíduo, que pode durar de 7 a 14 dias, a fase prodrômica inicia com mal-estar, febre, tosse, coriza e conjuntivite. Também podem ser encontradas na mucosa oral do indivíduo infectado, as manchas de Koplik, que permitem o diagnóstico clínico do sarampo antes do início do surgimento do exantema. Os primeiros sintomas antes da erupção do exantema (com exceção das manchas de Koplik) são semelhantes aos de outras doenças respiratórias comuns. O aparecimento do exantema ocorre após 3-4 dias do início do período prodrômico, em média 14 dias após a exposição ao vírus (Figura 7).





**Figura 7:** Sinais e sintomas manifestados na infecção pelo vírus do sarampo. (Ministério da Saúde, 2014).

O exantema do sarampo caracteriza-se por uma erupção maculopapular eritematosa que surge na face e atrás das orelhas, no nariz e após se espalha de forma centrífuga para o tronco superior. Depois de 3 dias se estende para o tronco inferior e extremidades (figura 8) (Perry e Halsey, 2004). O exantema desaparece e inicia uma descamação furfurácea e em alguns casos ocorrem esfoliações severas na pele. Se não houver complicações o paciente se recupera completamente adquirindo imunidade duradoura (Morley, 1969; Griffin, 2013; Rota *et al.*, 2016a).



**Figura 8:** Desenvolvimento e distribuição no corpo humano do exantema causado pela infecção pelo vírus do sarampo. Adaptado de Halsey *et al*, 2006 (Perry e Halsey, 2004).

A infecção pelo MEV pode levar a imunossupressão com sérias complicações e evolução a óbito. As complicações podem ocorrer em até 40% dos pacientes infectados, principalmente em indivíduos com distúrbios imunológicos, desnutrição, deficientes em vitamina A, crianças menores de cinco anos e adultos acima de 20 anos (Perry e Halsey, 2004). As complicações mais

comuns são as patologias respiratórias, especialmente pneumonia, as doenças diarreicas, e outras manifestações como cegueira e otite. Em crianças, a otite ocorre em 5-15% dos casos e pneumonia em 5-10%. Alguns estudos identificaram antígenos e RNA do MEV em tecido de casos progressivos de otosclerose (Mckenna e Mills, 1989; Niedermeyer *et al.*, 1994). Porém na literatura, em estudos mais recentes não foram encontradas evidências para a associação da causa da otosclerose ao MEV (Grayeli *et al.*, 2000; Komune *et al.*, 2012; Flores-García *et al.*, 2018). Em alguns casos raros, na infecção pelo sarampo pode acontecer envolvimento do sistema nervoso central (SNC), com complicações mais severas. Quatro formas de inflamação no cérebro foram descritas associadas ao sarampo: encefalite primária (PME), encefalomielite pós-infecciosa aguda (APME), encefalite por corpos de inclusão (MIBE) e panencefalite subaguda esclerosante (SSPE), cada uma com patogênese e aspectos patológicos diferentes (Buchanan e Bonthius, 2012).

## **1.5 SARAMPO MODIFICADO E ATÍPICO**

Estudos indicaram que o sarampo pode circular em indivíduos com baixos níveis de anticorpos, como os bebês que foram amamentados pela mãe e adquiriram anticorpos passivamente, indivíduos que receberam produtos sanguíneos que contêm anticorpos contra o sarampo, ou pessoas vacinadas contra o sarampo que tiverem quedas na imunidade. Ao entrar em contato com o MEV geralmente apresentam infecções subclínicas, sinais e sintomas modificados ou brandos ou até mesmo infecções assintomáticas (Krugman *et al.*, 1962; 1963; Helfand *et al.*, 1998; Bennett *et al.*, 1999; Sugerman *et al.*, 2010). Artimos de Oliveira *et al.* descreveram dois casos de sarampo em uma residência onde um caso se manifestou de maneira clássica e o outro caso a doença se manifestou de maneira diferenciada (Artimos De Oliveira *et al.*, 2000). No sarampo modificado, a duração e intensidades dos sinais e sintomas são alterados. O período prodrômico é menor, a febre, tosse e coriza são de baixa intensidade. As machas de Koplik e o exantema podem não ocorrer ou se apresentados, ocorrem com baixa progressão. A alteração nos sintomas clássicos em indivíduos vacinados dificulta o diagnóstico da doença e confunde

com as doenças diferenciais, sendo frequente um diagnóstico errado, impossibilitando atividades de bloqueio (Rosen *et al.*, 2014), principalmente se o indivíduo apresentar o IgM não reagente nos ensaios de sorologia, visto que é o primeiro critério, para definir se o caso é positivo ou negativo (Artimos De Oliveira *et al.*, 2011; Rota, J. S. *et al.*, 2011).

Uma outra classificação considerando o diagnóstico clínico e as manifestações da doença é o chamado sarampo atípico. Foi descrito pela primeira vez na década de 1960 em associação com a vacina contra o sarampo inativada por formalina (Fulginiti *et al.*, 1967; Melenotte *et al.*, 2015). As crianças que receberam tal vacina desenvolveram febre alta, erupção cutânea mais proeminente nas extremidades e frequentemente incluíram petéquias e alta taxa de pneumonia (Rauh e Schmidt, 1965). Foi associado a alta frequência de envolvimento pulmonar com encolhimento dos infiltrados pneumônicos e lesões tipo massa nodular, com o resíduo nodular persistindo por meses (Young *et al.*, 1970; Pang *et al.*, 2008).

Indivíduos infectados com o MEV que apresentam sinais e sintomas subclínicos, ao ser atendidos em uma unidade de saúde podem não ser diagnosticados clinicamente como sarampo ou até mesmo iniciar um surto no ambiente hospitalar (Yeung *et al.*, 2005; Bowen *et al.*, 2009; Filia *et al.*, 2015). No mês de fevereiro de 2017 ocorreu um surto envolvendo 35 pessoas em um hospital na Itália, onde os profissionais de saúde, pessoal de apoio que trabalhavam no hospital, visitantes e contatos da comunidade foram acometidos. O diagnóstico tardio do caso índice e o contato dos envolvidos no departamento de emergência tiveram um papel importante na difusão da infecção e manutenção do surto (Porretta *et al.*, 2017).

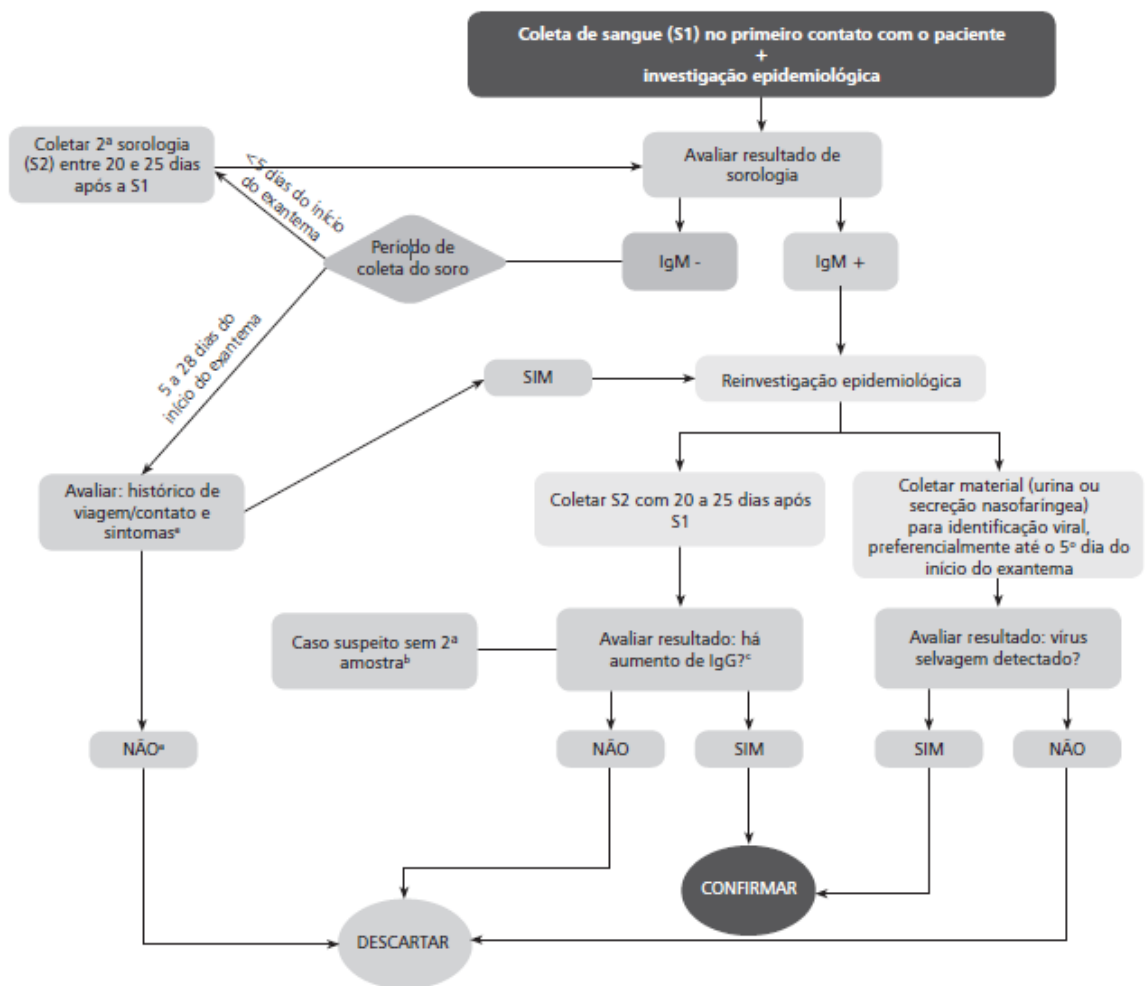
As manifestações clínicas clássicas e principalmente as manifestações clínicas modificadas do sarampo podem ser confundidas com outras doenças exantemáticas febris agudas (rubéola, exantema súbito, eritema infeccioso), com enterovirose (coxsackie e echovirose) com ricketioses e com outras doenças virais (herpesvírus-6 humano, herpesvírus-7 humanos) e arboviroses (Griffin, 2013; Ministério da Saúde, 2014).

Em 2015, no Brasil iniciou-se um surto de zika, dengue e chikungunya concomitantemente. Devido a dificuldade de testes sorológicos específicos para

diagnosticar tais arboviroses, diversos casos foram analisados apenas pelas manifestações clínicas apresentadas (Brasil *et al.*, 2016; Petersen *et al.*, 2016). Possivelmente, casos de sarampo podem ter sido diagnosticados como falso positivo para estas arboviroses. Dessa maneira, o diagnóstico laboratorial é fundamental na confirmação dos casos suspeitos, principalmente em áreas com baixa incidência ou casos isolados sem vínculo epidemiológico (Ministério da Saúde, 2014).

## **1.6 DIAGNÓSTICO**

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define como caso suspeito qualquer indivíduo que apresente como sinais e sintomas: erupção maculopapular generalizada, febre acima de 38°C e um dos seguintes sinais: tosse, coriza ou conjuntivite e considera fatores de risco epidemiológicos, como viagens para áreas em que está ocorrendo surtos ou áreas com doença endêmica. Atualmente, o diagnóstico de sarampo baseia-se em três elementos: manifestações clínicas, dados epidemiológicos e resultados de testes laboratoriais. Na figura 9 é ilustrado o fluxograma para confirmação ou descarte dos casos suspeitos de sarampo pelo Ministério da Saúde (MS). A vigilância no prazo adequado do sarampo é fundamental para o controle da doença. A identificação e confirmação dos casos suspeitos do sarampo por meio da vigilância permite a detecção precoce dos surtos, medidas de controles com vacinação para interromper a transmissão contínua e estima a incidência correta com base nos dados relatados pelos países. Os países membros da OMS enviam relatório mensais dos casos suspeitos e confirmados identificados através dos sistemas de vigilância. Entretanto o número de casos relatados tanto nos sistemas de vigilância como na OMS é subestimado, visto que muitos indivíduos doentes não procuram atendimento médico ou ainda se o caso for diagnosticado, isso não é a garantia deste ser reportado à OMS pelos países (OMS, 2018b).



**Figura 9:** Fluxograma utilizado pelo Ministério da Saúde do Brasil para confirmação ou descarte do caso suspeito de sarampo (Saúde, 2014).

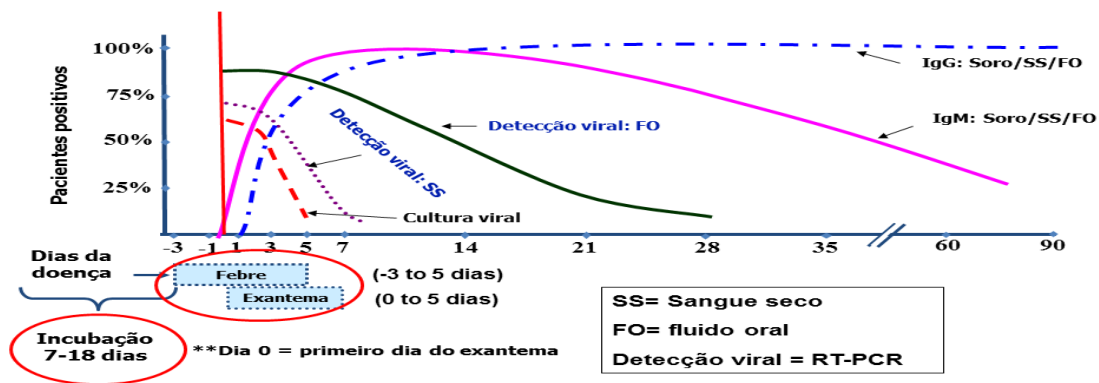
### 1.6.1 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial é feito pela detecção de IgM no soro ou na saliva na fase aguda da doença ou pela demonstração de soroconversão em amostras de soro coletadas em diferentes períodos para demonstrar o aumento da IgG nas duas fases, aguda e convalescente da doença. O método recomendado pela OMS para a confirmação dos casos suspeitos de sarampo diagnosticados clinicamente é a detecção por ensaio imunoenzimático (EIE). Devido a objetividade na interpretação dos resultados, a técnica imunoenzimática mais utilizada nos centros de referência é o ELISA (do inglês de Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) para a detecção da IgM e IgG (Bellini e Helfand, 2003).

Anticorpos específicos da classe IgM geralmente são produzidos no mesmo período que o exantema e são confirmatórios da doença. As amostras de soro devem ser coletadas no primeiro contato com um caso suspeito e o período ideal para detecção da IgM é a partir do 3º dia do aparecimento da erupção cutânea e permanecem detectável durante 30 a 60 dias na maioria dos indivíduos doentes, como pode ser observado na figura dos marcadores biológicos da infecção (figura 10). Nos ensaios de sorologia para IgM foi observado sensibilidade mais alta entre os dias 4 a 28 após o exantema. O teste é menos sensível nos dois primeiros dias após o início do exantema, nas primeiras 72 horas após o exantema e 20% dos testes para IgM podem dar resultado falso-negativo (Helfand *et al.*, 1999). Por isso a época da coleta da amostra de sangue e a sensibilidade dos testes de diagnóstico empregados devem ser considerados no momento de interpretação dos resultados. As amostras clínicas devem ser coletadas até o 5º dia a partir do aparecimento do exantema, preferencialmente nos primeiros 3 dias, não devendo ultrapassar 5 dias após o início do exantema (Helfand *et al.*, 1998; Bellini e Helfand, 2003).

Para a avaliação da IgG é necessária a elevação de quatro vezes ou mais o título deles entre fase aguda e convalescença da doença. A IgG eventualmente aparece na fase aguda da doença, por esse motivo as amostras são consideradas oportunas quando são coletadas entre o 1º e o 28º dia do aparecimento do exantema. A segunda coleta da amostra de soro deve ser realizada entre 20 a 25 dias após a data da primeira coleta. O fluido oral e o

sangue capilar seco são usados como alternativa ao soro em alguns sistemas de vigilância. Nos fluidos orais além da detecção dos anticorpos por técnica de sorologia também podem ser utilizados para a detecção do RNA viral (figura 10) (CDC, 2008a).



**Figura 10:** Marcadores biológicos da infecção pelo vírus do sarampo e utilidade dos ensaios de acordo com o início da erupção cutânea. Adaptado de OMS – Laboratórios de referência de sarampo e rubéola (CDC, 2008a).

Por técnicas moleculares, o caso suspeito pode ser confirmado com detecção do RNA viral por PCR em tempo real ou RT-PCR em amostras clínicas de swab de naso e orofaringe, células mononucleares do sangue periférico ou urina. A detecção do vírus também pode ser feita por isolamento viral da amostra clínica em cultura de células, porém essa técnica é demorada e laboriosa. A PCR é mais sensível e o resultado é obtido mais rapidamente. O período da coleta da amostra clínica irá influenciar na sensibilidade do teste diagnóstico. A sensibilidade será maior se as amostras forem coletadas o quanto antes, após o início do exantema. Em casos esporádicos, para não perder a oportunidade de se obter amostras para o isolamento viral, o período pode ser estendido em até sete dias após a data do início do exantema (OMS, 2012).

As técnicas de inibição da hemaglutina (HI), neutralização por redução de placa (PRNT), inibição da hemolisina (HLI), fixação de complemento (CF) podem ser utilizadas como diagnóstico, porém apresentam algumas limitações mais laboriosas para o desenvolvimento, como testes confirmatórios de rotina. A rede de referência utiliza a técnica de ELISA para a detecção de IgM e IgG e para o

diagnóstico molecular é realizado a detecção viral pela técnica de PCR em tempo real (OMS, 2012).

## **1.7 TRATAMENTO E CONTROLE**

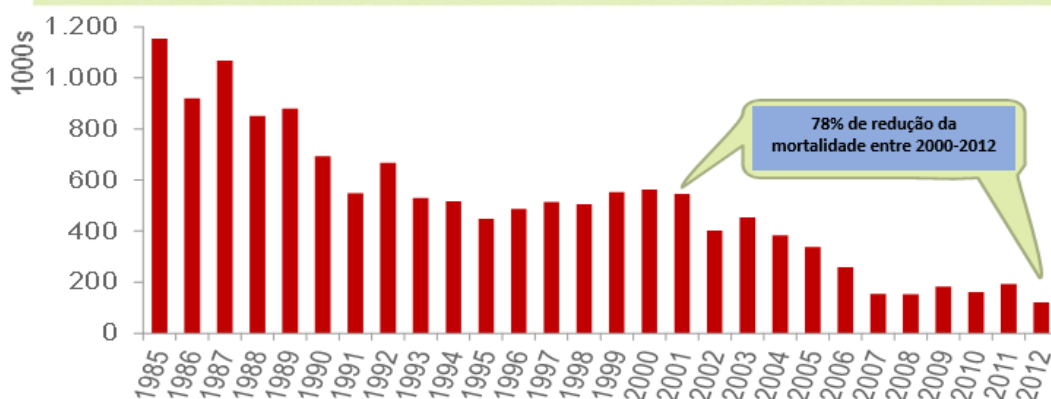
Ainda não há disponível um tratamento específico para a infecção por sarampo ou uma terapia antiviral específica para o tratar a doença. Apenas o tratamento de apoio onde ocorre o gerenciamento de febre, hidratação e suporte nutricional adequado com administração de vitamina A. Para o controle, há disponível uma vacina desde 1960.

O MEV possui características favoráveis para à sua erradicação, tais como, ter o homem como único hospedeiro, ser monotípico e facilmente diagnosticável após o aparecimento do exantema (Moss e Strebel, 2011; Moss, 2017). Estudos foram realizados e comprovaram que a vacina do sarampo representa uma das melhores intervenções na área de saúde já realizadas em relação a custo-benefício. A vacina tem baixo custo de produção, induz altos índices de soroconversão e foi capaz de interromper a transmissão viral em extensas áreas geográficas, mostrando-se uma ferramenta crucial para a eliminação global da doença (Thompson e Odahowski, 2016). A vacinação contra o sarampo tem desempenhado papel fundamental para a redução da mortalidade infantil, contribuindo assim, com um dos objetivos do Desenvolvimento do Milênio, que visa a redução da mortalidade entre as crianças menores de cinco anos em dois terços no índice (CDC, 2009). O número de mortes reduziu 79%, estimando que 17,1 milhões de vidas foram salvas desde 2000 devido ao aumento da cobertura de vacinação. Todos os países têm incluído no calendário de vacinação de rotina pelo menos uma dose da vacina contra o sarampo, porém apenas 122 países (63%) atingiram o objetivo de 90% das crianças vacinadas. A segunda dose da vacina ainda não foi acrescida no calendário de vacinação de todos os países, fazendo com que apenas a metade das crianças do mundo estejam recebendo a segunda dose recomendada (OMS, 2009b).



Até 2010, a mortalidade global por sarampo diminuiu 74%, indo de 535.300 mortes, em 2000, para 139.300, em 2010 (M&Ri, 2017). Do ano 2000 até o ano 2012, a mortalidade por sarampo foi reduzida 78% conforme mostra a figura 11 (Rota *et al.*, 2016a). A mortalidade por sarampo foi reduzida em mais de três quartos de todas as regiões da OMS, exceto no sudeste asiático, onde a Índia representou 47% da mortalidade estimada em 2010, e na África, que representou 36% das mortes totais (Simons *et al.*, 2012). De acordo com estimativa da OMS, em 2015, ocorreram 5,9 milhões de mortes de crianças menores de cinco anos, e metade foi causada por doenças infecciosas, onde o sarampo está incluído, representando 1% do índice (Unicef *et al.*, 2015).

**Redução de mortes por sarampo, 1985-2012**  
**Objetivo: 95% de redução entre 2000 a 2015**



**Figura 11:** Redução da mortalidade por sarampo, entre 1985 a 2012 em todo o mundo. Adaptado por Rota *et al* 2016 (Rota *et al.*, 2016a).

A maior parte das vacinas atenuadas contra o sarampo utilizadas no mundo derivou da cepa viral Edmonston como a Moraten, Schwarz e Edmonston-Zagreb (Griffin, 2013). No Brasil, a cepa vacinal empregada é Schawrz. De 1973 a 1992 era aplicado uma dose da vacina monovalente e a idade mínima para receber a vacina era de oito meses. Em 1976, a idade mínima passou a ser para sete meses de idade e em 1982 a idade ideal mudou novamente para nove meses, com base em um estudo de imunogenicidade. Atualmente, o esquema considerado para a vacina contra o MEV ocorre em indivíduos com 12 meses a 29 anos, onde devem receber duas doses de vacina com componente sarampo: a primeira dose deve ser aplicada aos 12 meses com

a vacina tríplice viral e aos 15 (quinze) meses, uma dose da vacina tetra viral (corresponde à segunda dose da vacina tríplice viral e primeira dose da vacina contra varicela). Adultos de 20 a 29 anos devem receber duas doses e de 30 a 49 anos devem receber uma dose da vacina tríplice viral (Ministério da Saúde, 2018). A OMS recomenda duas doses da vacina contra o sarampo para garantir a imunidade (90), devido a cerca de 7% das crianças vacinadas não desenvolverem imunidade a partir da primeira dose, com uma programação de duas doses da vacina atinge 97% de eficácia. Os outros 3% de indivíduos vacinados que contraem sarampo geralmente apresentam a forma mais branda da doença (Jin, 2015).

Efeitos adversos relatados referentes a vacina contra o sarampo no programa nacional de vacinação Programa Nacional de Imunização foram considerados leves e transitórios, com um bom histórico de segurança. Os eventos adversos mais comuns são dor de cabeça, dor na região da injeção, febre e erupção cutânea começando 8-12 dias após a vacinação (Tosun S, 2017). A maioria destas reações é resolvida rapidamente, sem necessidade de intervenção clínica (Naniche *et al.*, 2000). A imunossupressão causada pela infecção foi detectada após a vacinação, mas com menor intensidade do que a imunossupressão causada pela doença (Okada *et al.*, 2001). Estudo comparativo entre as linhagens Schawrz, Moraten e Edmonston demonstrou que as três apresentavam altas taxas de soroconversão. Foi constatado que a cepa Edmonston causou maior incidência de exantema cutâneo e febre que as demais. Em relação a Schawrz e a Moraten, a linhagem Schwarz causou mais febre entre os vacinados que a Moraten (Auwaerter *et al.*, 1999)

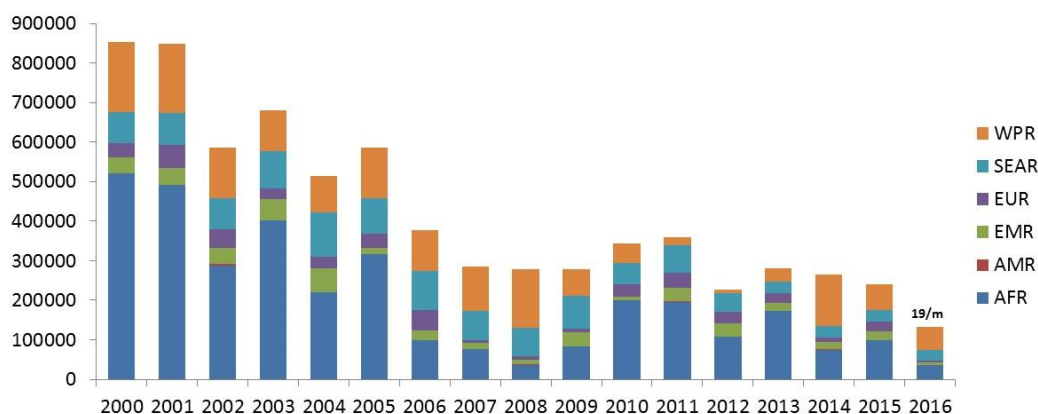
Em uma revisão sistemática de 773 artigos tratando de confirmação por genotipagem de vírus de casos vacinais não foi evidenciado nenhum caso de transmissão entre humanos do vírus vacinal em milhares de amostras clínicas durante os surtos ocorridos em todo o mundo (Greenwood *et al.*, 2016).

## 1.8 EPIDEMIOLOGIA DO SARAMPO

O sarampo é uma doença altamente contagiosa e infecciosa. O vírus é mantido em população humana por cadeia ininterrupta de infecção aguda. O homem é o único hospedeiro natural descrito (Moss, 2017). Possui distribuição universal sendo uma das principais causas de morbimortalidade em menores de 5 anos no mundo. Antes do desenvolvimento e do uso difundido das vacinas contra sarampo a estimativa anual de mortes causadas por esta doença era de 5-8 milhões por ano. O comportamento da doença endêmico ou epidêmico depende do grau da imunidade e susceptibilidade da população. Geralmente em locais onde a cobertura vacinal está abaixo de 95%, não homogênea e em população com menos de 10% de indivíduos susceptíveis ocorrem surtos e epidemias, com intervalos de dois ou três anos (Gay, 2004). Esses intervalos resultam da acumulação de indivíduos susceptíveis entre sucessivas coortes de nascimentos e o declínio subsequente no número de indivíduos susceptíveis após um surto. O ser humano torna-se susceptível a doença quando perde o anticorpo contra o sarampo recebido passivamente via transplacentária, cuja mãe recebeu a vacina contra o sarampo ou teve a doença natural (Cáceres *et al.*, 2000).

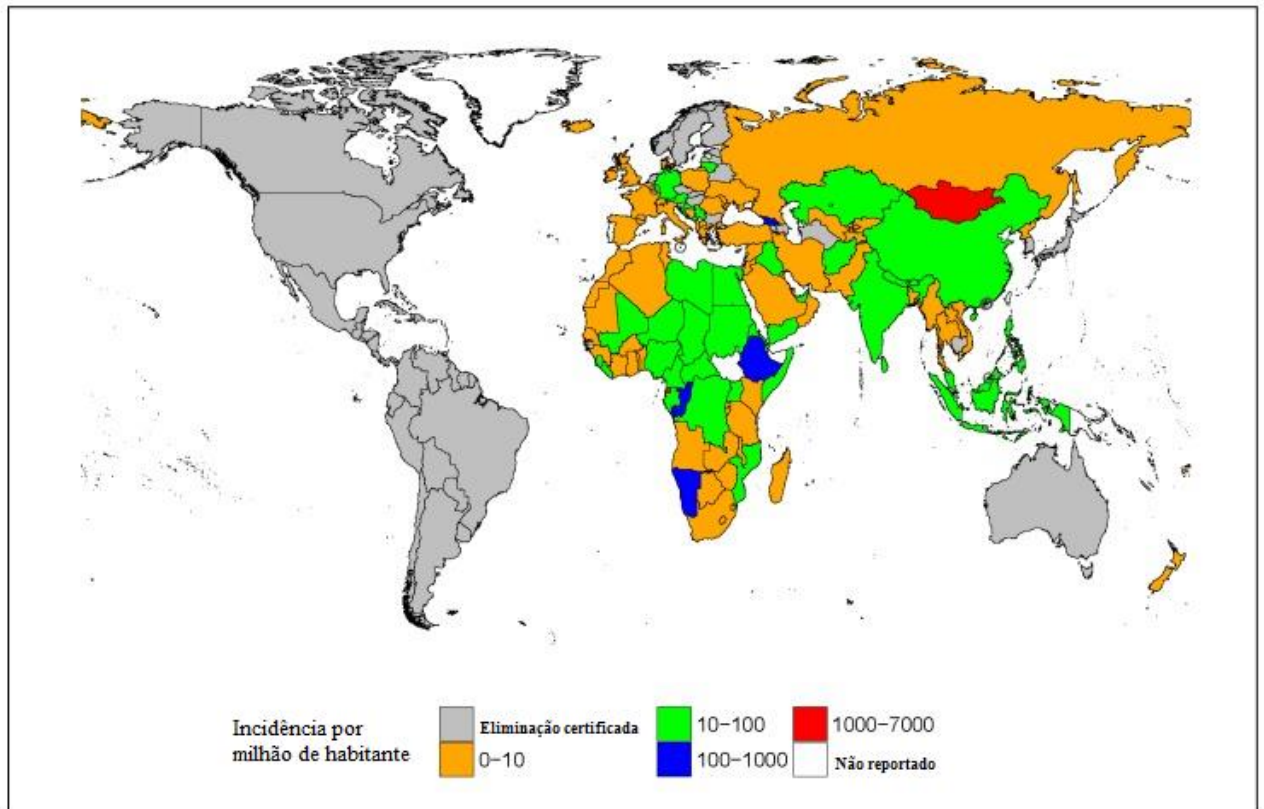
Discussões sobre a viabilidade da erradicação do sarampo foram levantadas logo após a comprovação de que a vacina proporciona imunidade prolongada nos indivíduos vacinados. Além do homem ser o único reservatório do MEV, também há disponível um teste laboratorial confiável para a confirmação da infecção pelo vírus. Especialistas julgaram ser possível a eliminação e a erradicação do sarampo no mundo (Hinman, 1982; Moss e Strebel, 2011). No início da década de 1990, com o sucesso do programa de eliminação da poliomielite, a OPAS decidiu trabalhar em conjunto com os países da América pela eliminação do sarampo. A eliminação do sarampo é definida como a interrupção da transmissão do sarampo em grandes áreas geográficas por um período de 36 meses enquanto que a erradicação é a interrupção global da transmissão do sarampo (Moss e Strebel, 2011). Em 2001, após a significativa redução da incidência do sarampo nessa região, a OMS, a Iniciativa do Sarampo (“Measles Initiative”), uma parceria da Cruz Vermelha nas Américas Cross (“America Red Cross”), Fundação das Nações Unidas (“United Nations

Foundation”), Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (“United States Centers for Disease Control and Prevention” - CDC), e a Fundação das Nações Unidas para a Infância - UNICEF (“The United Nations Children’s Fund”) desenvolveram o plano estratégico global para o sarampo com o objetivo de reduzir as mortes pelo sarampo em 95% entre 2000-2015. Entre o ano 2000 a 2014 foi estimado a redução de 72% da incidência dos casos de sarampo nas regiões da OMS (Figura 12).



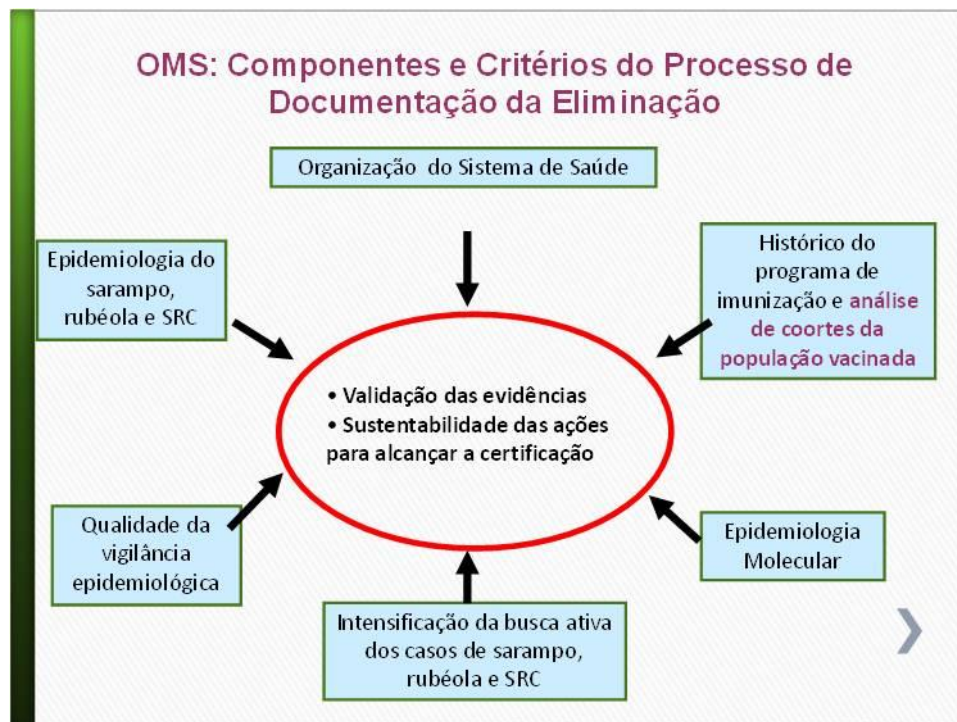
**Figura 12:** Casos de sarampo reportados por região da OMS, 2000 a 2016. Adaptado de Mulders. (Mulders, 2018). Regiões da Organização Mundial da saúde: Pacífico Ocidental (WPR), Sudeste Asiático (SEAR), Europa (EUR), EMR (Mediterrâneo oriental), América (AMR), África (AFR).

A OMS decidiu pela eliminação da doença e todos os estados membros nas seis regiões mundiais estabeleceram a vacinação e as estratégias de eliminação com vigilância epidemiológica e laboratorial para o controle da doença. Inicialmente o prazo era 2010, foi revisto para 2015 (Mulders *et al.*, 2016). Somente a região das Américas e alguns países da região do Pacífico Ocidental (Austrália, Macau (China), Mongólia e Republica da Coréia) e Pacífico Oeste (Brunei Darussalam, Camboja e Japão) (M&Ri, 2017) obtiveram sucesso no plano por isso o prazo foi expandido para 2020 nas outras regiões da OMS (Figura 13) (Rota *et al.*, 2016a).



**Figura 13:** Incidência atual do sarampo e países com eliminação verificada. Representação de 2015 por casos de sarampo por milhão de população, coberta com países para os quais a eliminação do sarampo foi oficialmente certificada. Adaptado de Coughlin et al, 2017.

Em 2011, a OPAS estabeleceu um Comitê Internacional de Peritos e publicou uma "Recomendação para documentação e verificação da eliminação do sarampo (assim como da rubéola e da síndrome congênita) nas Américas" para que os países documentassem a eliminação (OMS e OPAS, 2017). A documentação baseou-se em dados sobre a epidemiologia, qualidade da vigilância, da epidemiologia molecular, das coortes da população vacinada e da sustentabilidade da vigilância do sarampo (Figura 14).

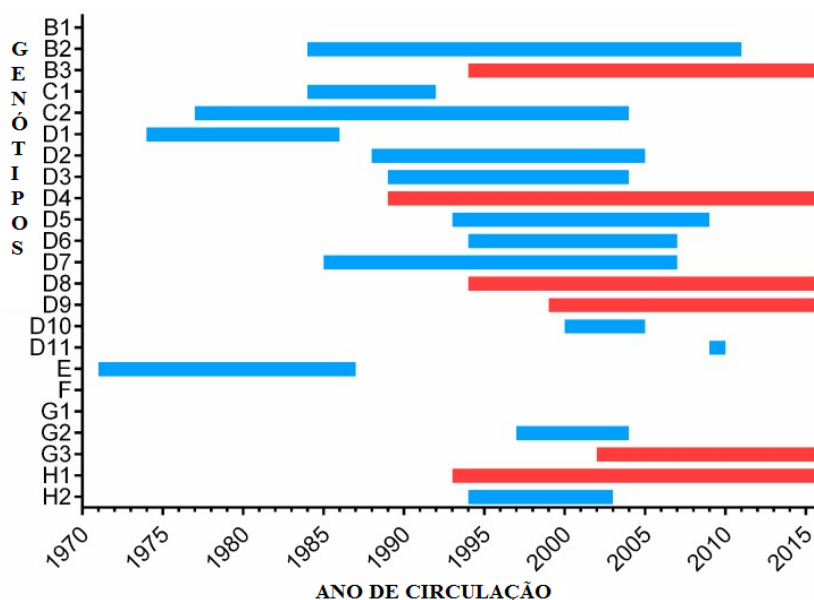


**Figura 14:** Componentes recomendados para a documentação da eliminação do sarampo. Adaptado de Castillo-Solórzano *et al* (Castillo-Solórzano *et al.*, 2011a).

## 1.9 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

A epidemiologia molecular como vigilância no programa de eliminação do sarampo baseia-se na variabilidade genética do MEV. É um dos critérios para evidenciar a ausência de um genótipo endêmico, diferenciando os casos autóctones dos importados, bem como, os vírus vacinais dos selvagens. A caracterização genética clássica do MEV é realizada pelo sequenciamento da região dos genes que codificam para as proteínas N e/ou H as quais contêm a maior quantidade de variabilidade genética no genoma do MEV (Santibanez *et al.*, 2002; Prevots *et al.*, 2003; Rota *et al.*, 2011). O gene N tem sua maior variabilidade nos 450 nucleotídeos que codificam para os 150 aminoácidos da região carboxi-terminal da proteína N, onde pode exceder 12% de diferença entre os vírus de diferentes genótipos. O sequenciamento dessa região do gene N é recomendado para identificação e monitoramento dos genótipos circulantes no mundo. O sequenciamento de toda a região codificante do gene H é recomendado por permitir a identificação de cepas virais com propriedades antigênicas alteradas, discriminar genótipos das cepas que quando analisadas

pelo gene N possuem sequências de nucleotídeos idênticas ou quase idênticas e discriminar entre cepas vacinais e selvagens. A variação da sequência do gene H é no máximo de 7% (OMS, 2012). Desta forma, com base na análise comparativa das informações de sequências disponíveis para os genes N e H do MEV selvagem, foram designados 8 grupos virais principais, com classificação de A até H e subdivididos em 24 genótipos, que apresentam distribuições geográficas características. Os 24 genótipos reconhecidos são: A, B1, B2, B3, C1, C2, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11, E, F, G1, G2, G3, H1, H2 (OMS, 2009b; 2010). Porém apenas 6 (B3, D4, D8, D9, G3 e H1) genótipos foram reportados desde 2015 e 5 genótipos (B1, D1, E, F e G1) são considerados extintos por não circular há mais de 25 anos (Figura 15).



**Figura 15:** Ano da primeira e última detecção de genótipos de tipo selvagem do vírus do sarampo, 1970-2015. Adaptado de Coughlin *et al* (Coughlin *et al.*, 2017). As linhas em vermelho representam os genótipos que estavam sendo identificados até 2015.

Dentro dos genótipos, grupos de vírus com sequências idênticas ou quase idênticas do gene N são definidas como linhagens. Dentro das linhagens, os vírus são designados como variantes distintas, cada variante identifica eventos de transmissão contínua e esta se torna uma cepa nomeada após o reconhecimento por mais de um ano e por mais de um país (Rota *et al.*, 2011; OMS, 2012). Como exemplo, o genótipo D8 atualmente apresenta 16 cepas nomeadas, como pode ser observado na tabela 1. O título de cepa nomeada é dado pela base de dados global para a vigilância molecular do MEV (Vigilância

de nucleotídeos do sarampo, MEANS) iniciada em 2008. Nessa base de dados são reportadas sequências da região N-450 dos genes N e H para o propósito de rastrear caminhos de transmissão do MEV, a partir de comparação das sequências identificadas durante os surtos. O monitoramento da circulação do MEV iniciou na década de 90 e atualmente consta com a participação de 723 laboratórios em 187 estados membros, que é a rede mundial de laboratórios de sarampo e rubéola (M/R LabNet) (Santibanez *et al.*, 2015).

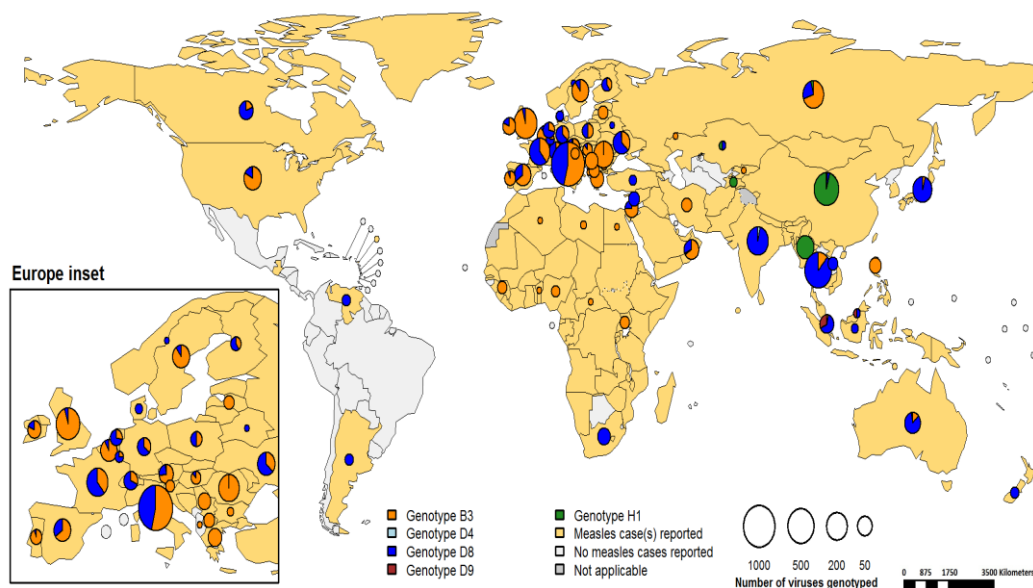
**Tabela 1:** Cepas nomeadas do genótipo D8 identificadas pela base de dados da rede global de sarampo (MeaNS).

Cepas nomeadas D8	País	Semana	GenBank
MMeV / Taunton.GBR / 27.12 /	Reino Unido	2012/27	JX984461
MMeV / Osaka.JPN / 29.15 /	Japão	2015/29	LC072667
MMeV / Frankfurt Main.DEU / 17.11 /	Alemanha	2011/17	KF683445
MVi / Villupuram.IND / 03.07 /	Índia	2007/3	FJ765078
MMeV / Rostov em Don.RUS / 47.13 /	Federação Russa	2013/47	KT588029
MMeV / Cambridge.GBR / 5.16 /	Reino Unido	2016/5	KX161662
MVi / Hulu Langat.MYS / 26.11 /	Malásia	2011/26	JX486001
MMeV / Herborn.DEU / 05.17 /	Alemanha	2017/5	KY973620
MMeV / República de Komi.RUS/35.13	Federação Russa	2013/35	KT588030
MMeV / Victoria.AUS / 6.11 /	Austrália	2011/6	KF469368
MMeV / Chui.KGZ / 53.14 /	Quirguistão	2014/53	KU728741
MMeV / Gadag.IND / 02.13 /	Índia	2013/2	KC862252
MMeV / Swansea.GBR / 4.13 /	Reino Unido	2013/4	KF214761
MMeV / Gir Somnath.IND / 42.16 /	Índia	2016/42	KY120864
MMeV / Pernambuco.BRA / 25.13 / 6	Brasil	2013/25	MH447525
MVi / Manchester.GBR / 30.94 /	Reino Unido	1994/30	AF280803

A combinação da epidemiologia molecular, da classificação genética e notificação de casos dos países fornece uma maneira sensível de descrever a distribuição territorial e os caminhos de transmissão do sarampo no mundo (Figura 16). A distribuição global dos genótipos possibilita o rastreamento da sua circulação geográfica através dos anos. Vários países utilizam esta ferramenta para monitorar seus programas de eliminação do sarampo (Fiebelkorn *et al.*, 2010; Rota *et al.*, 2011; Bankamp *et al.*, 2013). A vigilância epidemiológica possibilita desvendar a origem dos vírus introduzidos na população pelo monitoramento dos genótipos virais no país ou região ao longo do tempo. O controle do período de circulação do genótipo do vírus é um importante critério



para a comprovação da eliminação, visto que se um mesmo genótipo circular por mais de 12 meses em um país esse genótipo é considerado endêmico (Castillo-Solórzano *et al.*, 2011c). A OMS recomenda que seja coletada amostra clínica para a realização da genotipagem de 80% dos casos positivos dos surtos ocorridos nos países para a realização dos estudos de epidemiologia molecular das cadeias de transmissão de surtos (Rota *et al.*, 2011).



**Figura 16:** Distribuição global dos genótipos e incidência dos genótipos do vírus do sarampo – 2018. Fonte de dados: MeaNS database (Genótipos). Cobrindo o período 2017-02-01 a 2018-01-31 - Gráficos de pizza proporcionais ao número de vírus sequenciados <http://www.WHO-measles.org>.

Rota e colaboradores descreveram três padrões de distribuição dos genótipos e linhagens do MEV no mundo. Em países que ainda acontece a transmissão endêmica a maioria dos casos é causada por um ou vários genótipos endêmicos que estão geograficamente distribuídos. A mudança dos genótipos pode acontecer rapidamente em alguns países, como os europeus (OMS, 2012).

Em países que tiveram um bom controle, mas estão experimentando um aumento no número de indivíduos susceptíveis por causa da dificuldade de manter uma alta e homogênea taxa de cobertura vacinal. Nesta situação, uma reintrodução do sarampo geralmente pode resultar em surtos associados a um único genótipo do vírus, com sequências quase idênticas. Em países que estão próximos da eliminação do sarampo, a introdução de vírus sarampo pode resultar no surgimento de pequenos a moderados surtos que podem contribuir

para o estabelecimento e manutenção das cadeias internacionais de transmissão (Rota *et al.*, 2011).

Com o aumento na cobertura vacinal e eliminação da transmissão endêmica do MEV em alguns países, o número de casos de sarampo reduziu a diversidade do vírus circulante. Durante 2016 a 2017, apenas 5 genótipos foram detectados (B3, D4, D8, D9 e H11) no mundo. Acrescido ao intenso fluxo de viagens internacionais, a probabilidade da introdução de diferentes linhagens do mesmo genótipo no país aumenta. Em algumas situações a caracterização genética do vírus apenas pelo gene N pode ser insuficiente necessitando da análise de outras regiões do genoma do vírus para a monitoração das cadeias de transmissão (Bankamp *et al.*, 2013; Bankamp *et al.*, 2014). O sequenciamento do genoma completo ou de outros genes do vírus proporciona uma maior resolução nos estudos das vias de transmissão, incluindo as múltiplas fontes de importações de linhagens do mesmo genótipo que co-circulam (OMS, 2012). Casos não relacionados de sarampo com a mesma sequência genética desafiam a capacidade de distinguir várias importações de transmissão endêmica. Estudos da RNC-MF possibilitam melhorar a vigilância molecular nos surtos de sarampo, devido as informações obtidas das análises filogenéticas dessa região do genoma do MEV ser semelhante a análise do genoma completo (Penedos *et al.*, 2015; Rota e Bankamp, 2015; Harvala *et al.*, 2016)

Em países que já eliminaram o vírus, os poucos casos detectados são causados por uma série de diferentes genótipos que refletem diversas fontes do vírus importado e sugerem a falta de transmissão sustentada por genótipos endêmicos ou genótipos selvagens. Estudo de surtos realizado no Canadá conseguiu evidenciar a existência de diferentes linhagens do genótipo circulante através da análise do genoma inteiro do sarampo que auxiliou na análise do surto chegando à conclusão de que houve diferentes introduções, no período de um ano, do mesmo genótipo no país, logo não ocorrendo a endemidade da doença no país (Gardy *et al.*, 2015).

## 1.10 DIFICULDADES PARA A MANUTENÇÃO DA ELIMINAÇÃO DO SARAMPO

O sucesso do programa de eliminação do sarampo depende do empenho das campanhas de vacinação e do sistema de vigilância ativo com investigação dos casos e monitoramento rotineiro dos resultados epidemiológicos e laboratoriais (OMS, 2000; CDC, 2009). Foram definidos critérios para verificar a efetividade do programa de eliminação, como a não circulação do vírus de forma autóctone, definição da fonte e forma de propagação do vírus em surtos, realização de diagnóstico diferencial dos casos com IgM negativo e a pronta detecção do agente etiológico responsável por um determinado surto de doença exantemática (Bellini e Helfand, 2003).

As dificuldades com o controle da doença devem-se, em parte, ao fato de o vírus ser altamente infeccioso, espalhar-se facilmente pelos indivíduos susceptíveis, dificuldades em atingir altas coberturas vacinais com as duas doses da vacina (95%) e aos surtos de sarampo na população imunocomprometida ainda representarem um desafio para interromper a transmissão endêmica (Ge *et al.*, 2017). Em 2017, na Europa houve o aumento de casos de sarampo de quatro vezes quando comparado com o ano de 2016. Diversos países tiveram grandiosos surtos, mais de 21 mil pessoas foram acometidas e ocorreram 35 óbitos (OMS, 2018a). Nos países em que a vacinação reduziu substancialmente a incidência de sarampo, o agrupamento de pessoas não vacinadas e a incapacidade de manter uma alta cobertura da imunização infantil em todos os estados resultaram em ressurgimento do sarampo (Global reductions in measles mortality 2000-2008 and the risk of measles resurgence, 2009; OMS, 2009a; Sabella, 2010). Além da não implementação da segunda dose da vacina por fatores econômicos em países de baixa renda, existe também a recusa da vacina por alguns grupos da sociedade, o que propicia a formação dos bolsões de susceptíveis. Por diversos motivos sociais, ideológicos e/ou religiosos, os responsáveis não levam as crianças para se vacinarem. Indivíduos não vacinados por objeções ideológicas estiveram envolvidos em alguns surtos de sarampo (Muscat, 2011; CDC, 2011).

Um artigo foi publicado na revista Lancet em 1998 alegando um vínculo entre a vacina tríplice viral e o autismo. Vários estudos desmentiram o mito,

porém permeou uma informação errônea que levou à diminuição das taxas de imunização (Schneeweiss *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2014; Jin, 2015). Foi relatado um evento social chamado de “festa do sarampo” onde o objetivo do evento era reunir crianças saudáveis para a transmissão da doença por uma criança que estava infectada com o MEV e assim adquirirem a imunidade natural da doença (Tischer *et al.*, 2001).

### **1.11 ELIMINAÇÃO DO SARAMPO NAS AMÉRICAS**

Os países das Américas introduziram a vacina contra o sarampo na década de 1960. Em 1977, com o estabelecimento do Programa Ampliado de Imunizações (EPI) nas Américas por uma resolução do Conselho Diretor da OPAS, a região definiu como meta a redução da morbidade e mortalidade (Semenov *et al.*, 1996; Olivé *et al.*, 1997). De 1971 a 1977, cerca de 28 países das Américas haviam relatado média de 258.634 casos de sarampo por ano e períodos interepidêmicos de 2-3 anos. Com o uso generalizado da vacina contra o sarampo, observou-se em vários países prolongamento dos períodos entre as epidemias e também uma redução drástica nos casos de sarampo (De Quadros *et al.*, 1996).

A América do Sul foi pioneira na implementação de novas estratégias para eliminação do sarampo com campanhas de vacinação indiscriminada entre crianças de 1 a 14 anos (*catch-up*); manutenção da vacinação de rotina (*Keep-up*), por meio dos serviços de saúde pública em pelo menos 95% de crianças de 12 a 15 meses e campanhas de seguimento periódicas (Ruff, 1999). As primeiras campanhas de vacinação indiscriminada (*catch-up*) foram implantadas em Cuba em 1987 (Galindo *et al.*, 1998) e em 1992 no Brasil e Chile. Os esforços dos países pioneiros mostraram sucesso na interrupção da transmissão viral (Olivé *et al.*, 1997).

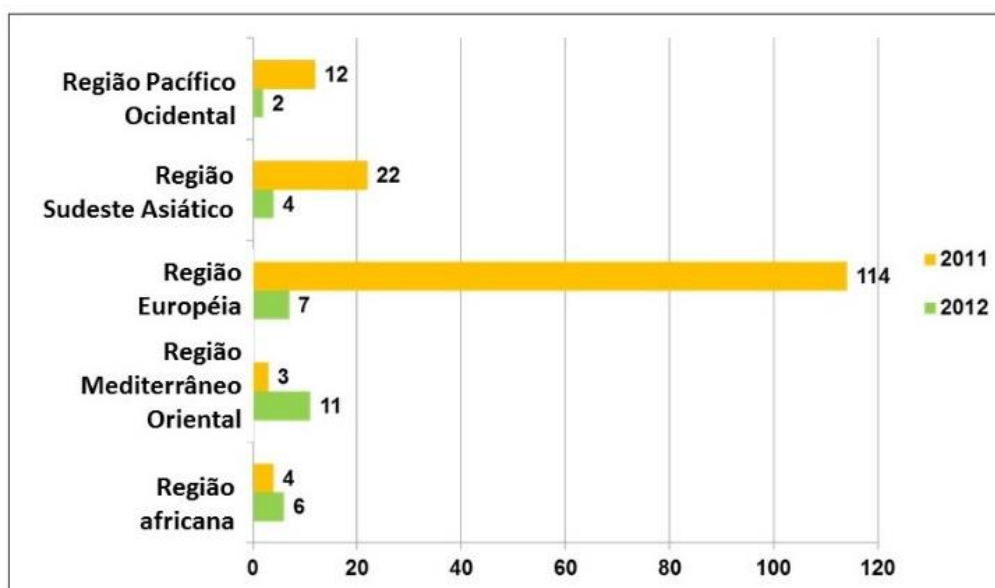
No período de 1988-1991, o sarampo ressurgiu em vários países das Américas. Em 1994, para alcançar a erradicação nas Américas, a OPAS, desenvolveu estratégias de vacinação tendo por base a epidemiologia da doença antes e após a introdução da vacina em 1963-1970 (prolongamento dos

períodos entre as epidemias e deslocamento da faixa etária) (Castillo-Solorzano, C. et al., 2011a).

Foi relatado o ressurgimento do sarampo em 1997 no Brasil com consequente exportação deste genótipo para outros países da América do Sul. O genótipo D6 foi identificado nessa epidemia e foi considerado endêmico nas Américas, sendo associado a subseqüentes surtos na Argentina, Bolívia, Haiti e República Dominicana (Siqueira *et al.*, 2001; Rota *et al.*, 2009). A ausência de vírus D6 apesar da identificação de outros genótipos em outras regiões suporta a eliminação do genótipo D6 das Américas (Hersh *et al.*, 2000).

No final de 2002, todos os países da América, exceto os Estados Unidos, conduziram campanhas de vacinação indiscriminada (*catch-up*), e muitos as complementaram com campanhas de seguimento (*follow-up*), oferecendo uma segunda oportunidade para as crianças receberem sua primeira dose da vacina contra o sarampo, enquanto que as que receberam uma dose prévia se beneficiariam com um reforço. Se em 1990 mais de 240 mil casos de sarampo foram relatados na região das Américas, em 1996 foi constatada uma redução de 99% em relação aos níveis anteriores (Cutts e Markowitz, 1994). A região das Américas cumpriu o prazo da eliminação do sarampo no ano de 2000 (Castillo-Solorzano, C. C. *et al.*, 2011c).

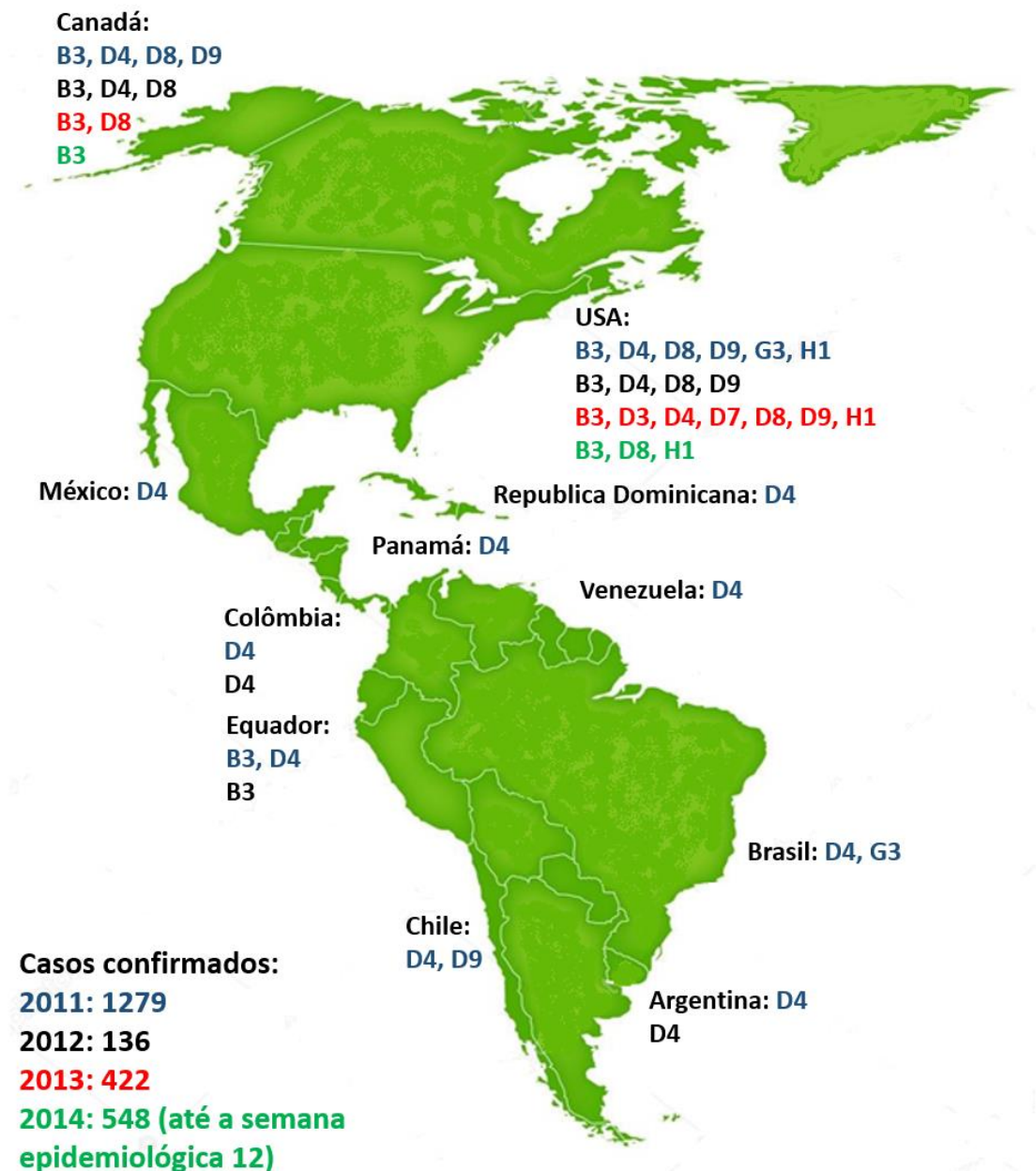
Desde 2003, a maioria dos casos de sarampo registrados nas Américas tem sido relacionados a importações da Europa (figura 17). Dos 524 casos confirmados de sarampo relatados durante 2008-2010, 222 foram importações de sarampo e 302 eram casos secundários desses casos. A fonte dos casos importados foi identificada apenas em 124 casos, e 35% destes eram importações da Europa. Os dados da vigilância do sarampo combinados com os resultados dos estudos de caracterização molecular indicam que os países das Américas estão continuamente expostos ao MEV proveniente de outras regiões do mundo onde a doença continua endêmica (Castillo-Solorzano, C. *et al.*, 2011c).



**Figura 17:** Fonte de importações identificadas nos anos 2011 e 2012 dos vírus do sarampo na região das Américas (Siqueira, 2015a).

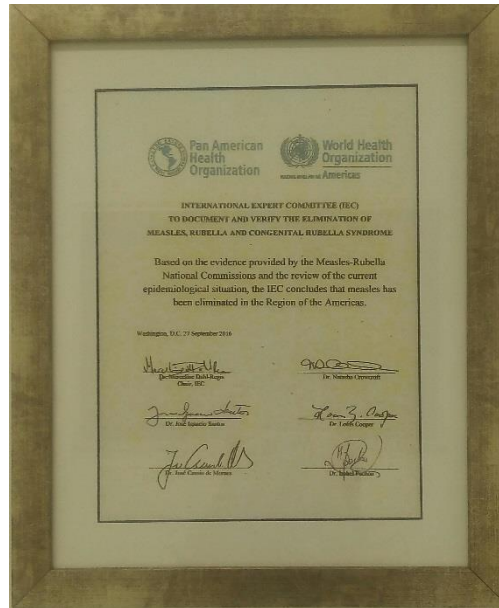
A epidemiologia do sarampo no período de pós eliminação (2000 a 2015) pode ser dividida em dois períodos. De 2000 a 2010 a situação foi considerada estável com poucos casos anuais (média anual de 160 casos). Entre os anos de 2011 a 2015, acentuou o número de casos, com a média anual subindo 5 vezes quando comparado com o primeiro período. No período de 2013-2014, houve elevada notificação de casos na região da América, com 58 surtos de sarampo notificados e 98% dos casos, nesse período, foram reportados pelo Brasil, Canadá, Estados Unidos e Equador (Figura 18). Parte do aumento do número de casos foi consequência de ter ocorrido surtos de grandes proporções em países da Europa e pacífico Ocidental nos anos de 2013-2014 (OMS e OPAS, 2017).

Os países das Américas entregaram a OPAS, entre 2011 e 2012, a documentação necessária para esta comprovação da eliminação do vírus. No entanto, em março de 2013, um surto de sarampo iniciou-se no Brasil, no estado de Pernambuco (PE), espalhando-se para o estado do Ceará (CE), com detecção de casos confirmados por mais de 12 meses de um único genótipo, evidenciando a endemidade no país. Com isto, o Brasil e as Américas perderam a possibilidade de certificar a eliminação do sarampo na região neste ano.



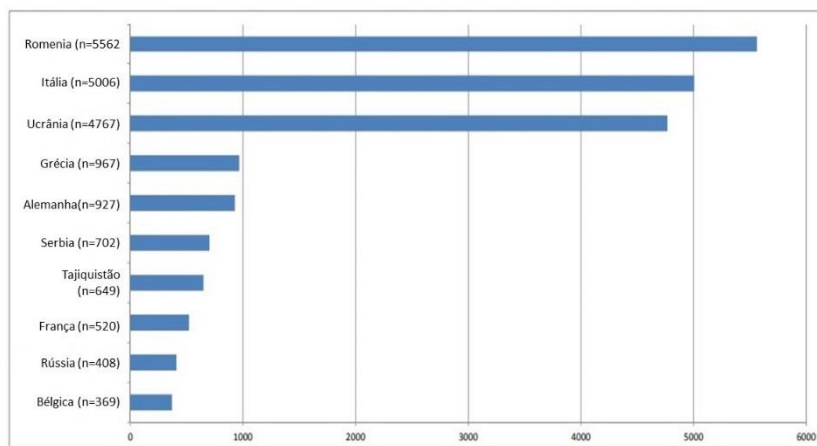
**Figura 18:** Genótipos de sarampo identificados na região das Américas no período de 2011 a semana epidemiológica 12 do ano 2014. Os genótipos identificados nos países estão descritos em azul (2011), preto (2012), vermelho (2013) e verde (2014).

Os peritos do comitê verificaram os documentos produzidos pelos países e demonstraram a eliminação do sarampo nos países do continente americano. O sarampo foi considerado eliminado das Américas em 2016 (Figura 19) e um novo plano de ação (2018-2023) foi proposto para assegurar a sustentabilidade da eliminação do sarampo nas Américas (OMS e OPAS, 2017).



**Figura 19:** Quadro com a declaração de eliminação do sarampo (arquivo pessoal).

O risco de reintrodução da doença persiste, mediante a importação de vírus de outros países/regiões onde o sarampo ainda é endêmico (Furuse e Oshitani, 2017). A região da Europa reportou no ano de 2017 quatro vezes mais de casos que reportou no ano 2016. Na figura 20 constam os 10 países que tiveram os maiores números de casos confirmados de sarampo no ano 2017 (OMS, 2018a).

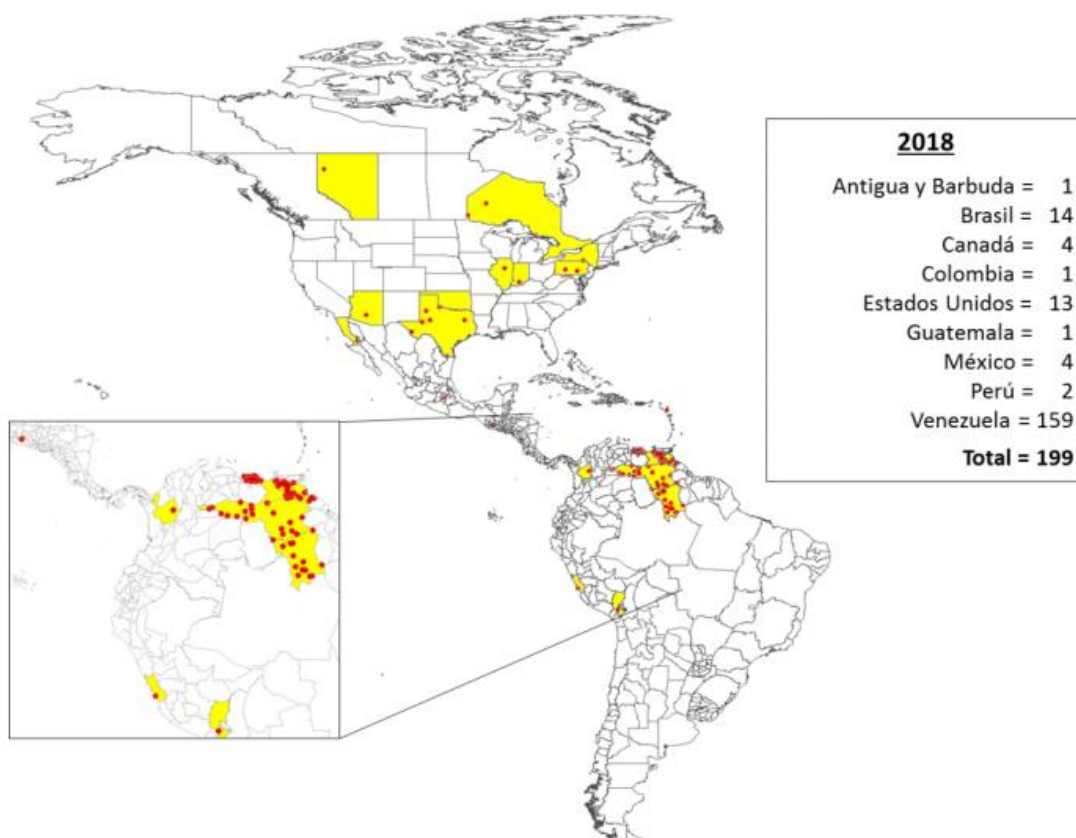


**Figura 20:** Os 10 países com os maiores números de casos confirmados de sarampo. Adaptado de OMS Europa, 2018.

Em 2017, quatro países da região das Américas relataram casos confirmados de sarampo: Argentina, Canadá, Estados Unidos da América e Venezuela. Nos primeiros meses de 2018 (até a semana epidemiológica 11 de



março), existem oito países que relataram casos importados confirmados: Estados Unidos reportou 13 casos e Canadá 3 casos. Antígua e Barbuda, Guatemala, México e Peru reportaram 1 caso. Na Venezuela um surto de sarampo iniciou no ano 2017, totalizando 159 casos até fevereiro de 2018 (Figura 21). Neste mesmo mês, no Brasil iniciou-se um surto com refugiados venezuelanos. O genótipo identificado nos dois países citados foi o D8 com sequência semelhante às sequências identificadas na Europa (OPAS e OMS, 2018).

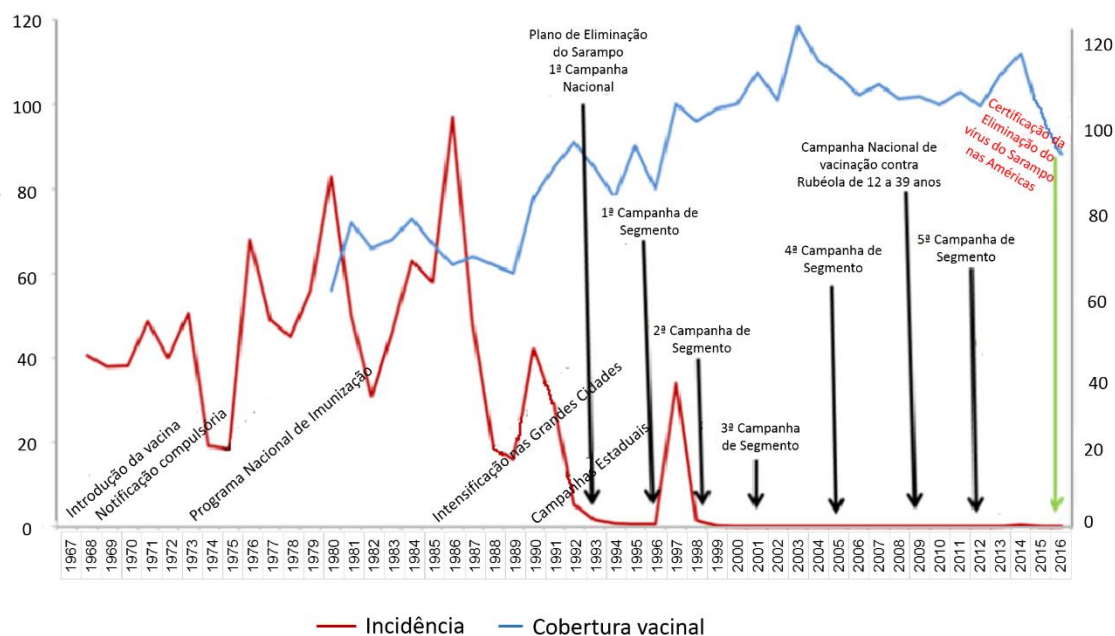


**Figura 21:** Distribuição de casos confirmados de sarampo na região das Americas – 2018 (OPAS, 2018).

## 1.12 SARAMPO NO BRASIL

O sarampo foi uma das principais causas de óbito dentre as doenças infectocontagiosas. Devido à gravidade e mortalidade causada, o sarampo passou a ser considerado doença de notificação compulsória desde 1968 no Brasil. Em 1973 houve a introdução do Programa Nacional de Imunização

quando a vacina foi implantada em todo país (figura 22). Na década de 70, as epidemias chegaram a acometer 2-3 milhões de crianças. O maior número de casos notificados foi registrado em 1986 (129.942), representando uma taxa de incidência de 97,7/100.000 hab. Na década de 80 houve o registro de 15.638 casos de óbitos decorrentes do sarampo.

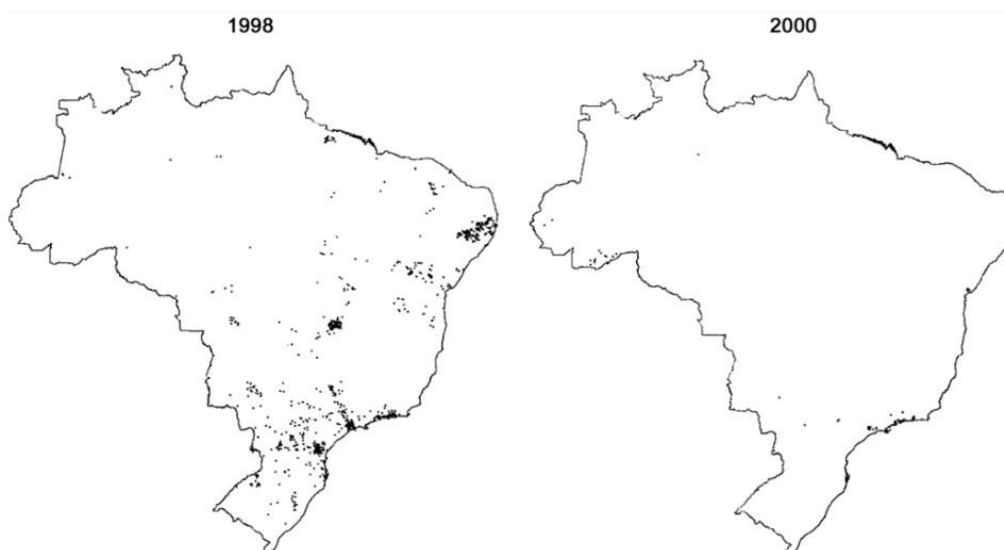


**Figura 22:** Estratégia de controle e incidência de 1968 a 2016 (Ministério da Saúde, 2017).

O país enfrentou dez grandes epidemias até o ano de 1992, quando, em decorrência do plano de eliminação do sarampo, uma campanha nacional de vacinação em massa foi realizada. A cobertura vacinal atingiu 95% da população de menores de 14 anos de idade e queda significativa da incidência do sarampo foi observada nos anos seguintes. Além de ter sido acrescido, nesse ano, para todo o território nacional, a aplicação de uma segunda dose de vacina de sarampo administrada dos 12 aos 15 meses. Em 1995 ocorreu a primeira campanha de seguimento e a segunda aconteceu dois anos após. De 1992 a 1996 houve redução de 81% no número de casos notificados. Alguns surtos esporádicos ocorreram nos estados da Bahia e Santa Catarina (em 1996) e a análise molecular identificou que os genótipos que circulavam eram D5 e C2, respectivamente (Siqueira *et al.*, 2001). Em 1997, os casos de sarampo elevaram-se acentuadamente. Houve epidemia em vários estados brasileiros com 91.810 casos notificados e 53.664 confirmados, taxa de incidência de

32,6/100.000 habitantes e 61 óbitos. A epidemia iniciou no Estado de São Paulo (o único estado do Brasil que não implementou a campanha de seguimento programada para 1995) e se espalhou para outros estados do Brasil e também outros países do continente americano (Hersh *et al.*, 2000). O genótipo identificado nesse surto foi o D6 provavelmente originado por um MEV importado da Europa (Siqueira *et al.*, 2001).

Para fortalecer a vigilância epidemiológica do Brasil, em 1999, o Ministério da Saúde criou o Grupo Tarefa no qual um técnico de vigilância do sarampo foi designado para cada um dos 27 estados. Os últimos casos autóctones ocorreram nos estados do Mato Grosso do Sul, Acre e São Paulo. Em 2000 foi considerada a interrupção do vírus no Brasil (figura 23).



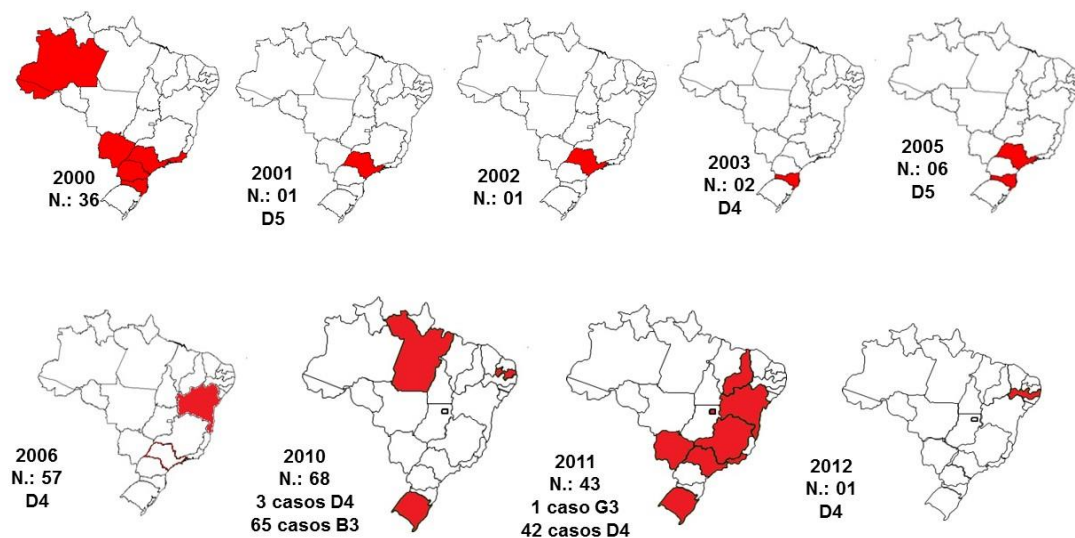
**Figura 23:** Casos de sarampo por município de residência, Brasil - 1998 e 2000. Cada ponto representa um caso. Adaptado de Prevots e colaboradores (Prevots *et al.*, 2003).

Dos 8.358 casos suspeitos notificados em 2000, 36 (0,4%) foram confirmados. Em 2001, somente um dos 5.599 casos suspeitos da virose foi confirmado e este caso foi classificado como importado (país de origem: Japão). Nos anos seguintes, apenas casos importados foram confirmados no Brasil: 1 em 2002 (país de origem: Japão) e 2 em 2003 (país de origem do caso índice: Alemanha). Estes dados demonstraram a interrupção da transmissão autóctone do sarampo no país (Prevots *et al.*, 2003).

A partir de 2001 ocorreram casos importados (Prevots *et al.*, 2003), mas sem grande magnitude e controlados por ações de prevenção e controle

(Ministério da Saúde, 2014; Dias LR e Berezin N, 2015). Na figura 24, observam-se os estados do Brasil que tiveram casos de sarampo no período de 2000 a 2012.

### Casos confirmados no Brasil, 2000 – 2012



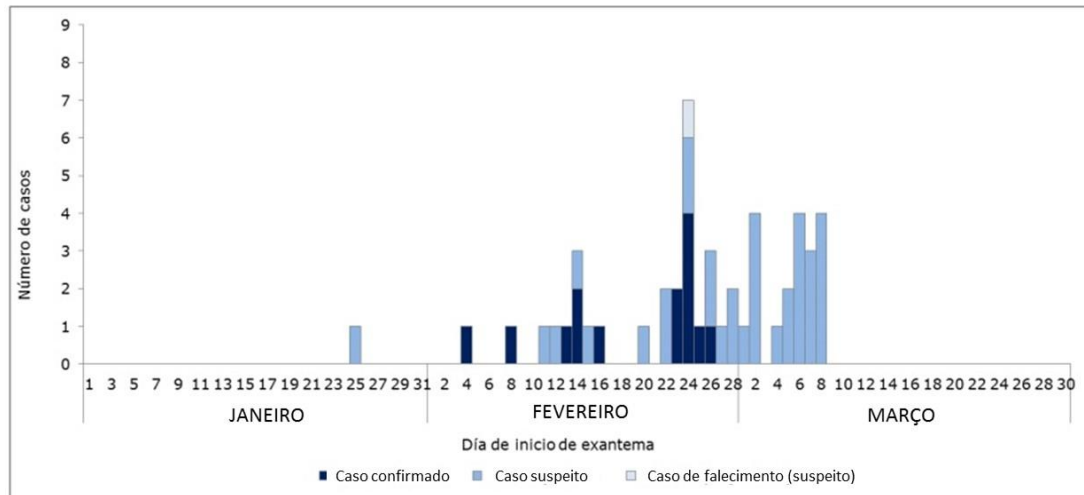
**Figura 24:** Casos confirmados e genótipos detectados no Brasil, 2000-2012. Adaptado de Siqueira (Siqueira, 2015b).

O maior número de casos relatados no Brasil, entre 2013 a 2015, ocorreu nos surtos de PE e CE, com 222 e 1052 casos confirmados respectivamente (Leite *et al.*, 2015). O surto iniciou em Pernambuco, atingindo 24 municípios. De 1153 casos suspeitos, 222 casos foram confirmados por testes laboratoriais e vínculos epidemiológicos. A vigilância não identificou vínculo do caso índice com viajante. Desses casos, 110 ocorreram em menores de um ano de idade, com óbito de uma criança do sexo feminino, com sete meses de idade, portadora de HIV e sífilis. O surto espalhou-se para o estado da Paraíba com 9 casos notificados. Neste mesmo período, casos esporádicos foram identificados.

Em dezembro de 2013, no Estado do Ceará, iniciou-se um surto que permaneceu por 20 meses, com 1.052 casos confirmados. Janeiro, julho e agosto de 2014 foram os meses com maior número de casos confirmados e com muitos esforços e vacinação, o surto foi contido e o último caso confirmado ocorreu em julho de 2015 (Ministério da Saúde, 2017; OMS e OPAS, 2017).

Na cidade de Boa Vista, Roraima (RR) iniciou-se um surto a partir de refugiados venezuelanos em fevereiro de 2018. O primeiro caso foi confirmado

na semana epidemiológica 08.2018, que corresponde a uma menina de um ano de idade, venezuelana, sem histórico de vacinação. Até a semana epidemiológica 10.2018, foram notificados 37 casos suspeitos de sarampo com um óbito. Oito casos foram confirmados em cidadãos venezuelanos no território brasileiro. (OPAS, 2018).



**Figura 25:** Distribuição dos casos reportados de sarampo de acordo com a classificação e semana epidemiológica em Roraima no início do surto em 2018 (OPAS e OMS, 2018).

## 2. JUSTIFICATIVA

O sarampo é um importante problema de saúde pública, devido à morbidade e mortalidade decorrentes desta infecção (Moss, 2017). Significativos avanços na erradicação dessa doença têm sido alcançados, sendo o mais recente, a certificação da Região das Américas como zona livre de sarampo pela Organização Pan-Americana da Saúde, em 2016 (OMS e OPAS, 2017). Entretanto, em várias regiões do mundo, a taxa de mortalidade por sarampo ainda é alta, especialmente nos países em desenvolvimento de outros continentes (OMS, 2018a). Apesar da disponibilidade da vacina há mais de cinco décadas, a cobertura vacinal não é homogênea no nível global (Gidding *et al.*, 2018). Isso acontece porque duas doses da vacina são necessárias para garantir a imunoproteção (Orenstein *et al.*, 2018), nos países em desenvolvimento a distribuição nem sempre é garantida à todas as crianças, como na Nigéria onde 77% das crianças de 12 a 13 meses não tem acesso a vacinação de rotina (Rota *et al.*, 2016b). Em alguns países desenvolvidos, existe grande resistência à vacinação, por medo de reações adversas (Halsey e Salmon, 2015). Esse conjunto de fatores mantém a circulação endêmica do MEV em algumas regiões, que funcionam como fonte de exportação para outras, sobretudo através de viagens internacionais (Halsey e Salmon, 2015). No contexto da globalização, o risco de epidemias de sarampo é permanente, mesmo nos locais onde a doença é considerada controlada (Furuse e Oshitani, 2017). Esse cenário pode ser ilustrado pelo recente surto de sarampo nos estados de Pernambuco e Ceará, no período 2013-2015, ou seja, já em fase de eliminação no Brasil (Leite *et al.*, 2015). Em 2014, o Brasil estabeleceu um “Plano de Contingência para Resposta às Emergências em Saúde Pública” para o Sarampo, o que possibilitou o controle do surto e a continuidade do processo de certificação de eliminação do sarampo, iniciado em 2000. Graças ao esforço continuado, entre 2015 e agosto de 2016, o Brasil, juntamente com os demais países da América, entregou ao Comitê Internacional de Peritos da OPAS as evidências da eliminação do sarampo, as quais foram consideradas satisfatórias para certificação (OMS e OPAS, 2017) .

Nessa conjuntura, cabe ressaltar o papel crucial de um sistema de vigilância bem estruturado e ativo para a detecção de possíveis casos

importados, bem como a adoção de medidas oportunas de controle, de modo a evitar a propagação do vírus e promover a devida contenção de surtos. No âmbito da vigilância laboratorial, a caracterização molecular dos vírus circulantes permite identificar a possível origem dos vírus introduzidos na população e estimar a sua disseminação. Atualmente, o protocolo de vigilância recomendado pela OMS preconiza a análise de um fragmento de 450 nucleotídeos da porção C-terminal do gene N do MEV, a porção mais variável do genoma viral (Rota *et al.*, 2011). Porém, estudos recentes sugerem que a diversidade genética do gene N é limitada para a investigação de surtos e cadeias de transmissão, a despeito de permitir a diferenciação de genótipos (Gardy *et al.*, 2015). Nesse contexto, é de suma importância investigar se os vírus classificados em um mesmo genótipo, mas obtidos a partir de casos sem relação epidemiológica entre si, são oriundos de transmissão endêmica ou de múltiplas introduções do vírus na população. Essa informação é absolutamente imprescindível num cenário de eliminação da doença. Em contrapartida, Harvala e cols., em 2016 demonstraram que a análise da região não codificante entre os genes M e F (RNC-MF) do MEV permite diferenciar linhagens dentro do mesmo genótipo permitindo, portanto, o rastreamento de surtos (Penedos *et al.*, 2015; Harvala *et al.*, 2016).

O objetivo geral do presente projeto consiste em investigar o surto recente de sarampo, ocorrido nos estados do Ceará e de Pernambuco no período 2013-2015, sob a perspectiva virológica. Nesse contexto, os genes N e RNC-MF foram sequenciados para rastreamento do referido surto, de modo a oferecer novas alternativas laboratoriais às ações da vigilância epidemiológica do MEV no Brasil. Ainda, considerando o cenário de eliminação desta virose nas Américas e a cobertura vacinal no país (Ministério da Saúde, 2013; Lemos *et al.*, 2017), propomos uma reanálise dos resultados laboratoriais, considerando os resultados sorológicos e moleculares, conhecimento fundamental para o diagnóstico dessa virose no atual cenário epidemiológico.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral do presente projeto consiste em investigar o surto recente de sarampo, ocorrido nos estados do Ceará e de Pernambuco no período 2013-2015, sob a perspectiva virológica.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Analisar a relação entre os resultados sorológicos e de detecção molecular por RT-PCR, considerando o atual cenário epidemiológico e a alta cobertura vacinal da população investigada.
- 2) Analisar a adequação de diferentes protocolos, com base na análise da região predefinida pela OMS, região N-450 e da região não codificante entre os genes M e F (RNC-MF), visando subsidiar estudos de epidemiologia molecular do MEV.
- 3) Investigar a diversidade genética e a distribuição de linhagens virais do MEV durante o surto ocorrido nos estados do Ceará e Pernambuco (2013-2015).
- 4) Investigar possíveis fontes de introdução do MEV, no âmbito do surto ocorrido nos estados do Ceará e Pernambuco (2013-2015), e analisar a sua dispersão.



## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO**

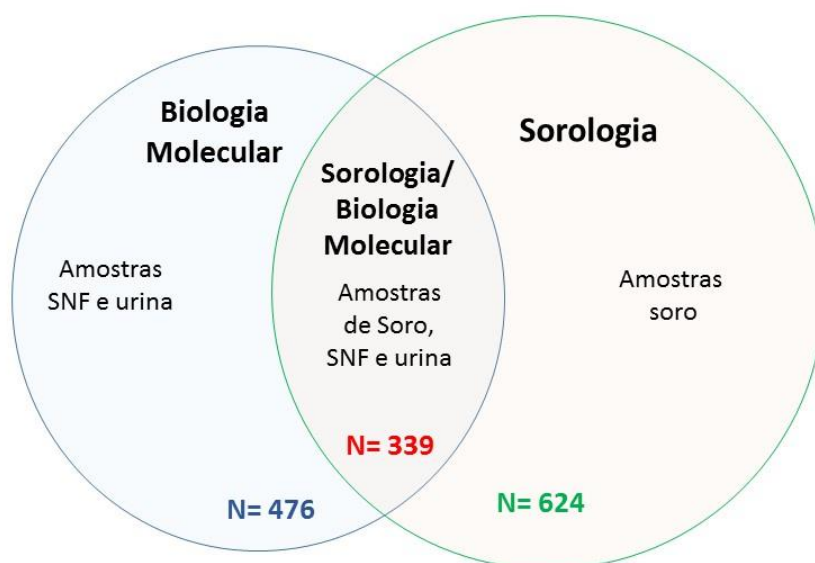
O presente estudo é do tipo descritivo e envolve parte dos casos confirmados de sarampo, investigados durante o surto nos estados do Ceará e Pernambuco, no período 2013-2015. O estudo foi realizado no Laboratório de Vírus Respiratório e do Sarampo (LVRS) / Instituto Oswaldo Cruz (IOC) / Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), que atua como Laboratório de Referência Nacional para o Ministério da Saúde e Centro de Referência Regional para a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Conforme previsto no escopo do programa de vigilância epidemiológica e laboratorial de sarampo, a sorologia dos casos suspeitos é realizada pelo Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) do estado de origem. Posteriormente, as amostras positivas são encaminhadas ao LVRS para a confirmação da sorologia e determinação de genótipo viral por sequenciamento. No período do estudo, devido a falta de insumos nos LACEN's recebemos amostras clínicas de casos suspeitos sem resultados para serem diagnosticadas laboratorialmente no LVRS.

O quantitativo de amostras recebidas no LVRS do surto de PE e CE, segundo estado e ano encontra-se descrito na tabela 2. Para o diagnóstico laboratorial de sarampo, preconiza-se que as amostras de soro sejam utilizadas para a análise sorológica, o passo que secreção nasofaríngea (SNF) e urina, para a detecção molecular por RT-PCR e genotipagem (OMS, 2012; Ministério da Saúde, 2014; Ministério da Saúde, 2017). As amostras de SNF e urina foram coletadas simultaneamente. Na Figura 26, encontra-se descrito o quantitativo de amostras clínicas recebidas dos LACEN's dos estados de Pernambuco (PE) e Ceará (CE) para serem testadas por técnica sorológica e/ou por técnica de detecção molecular no período de 2013 a 2015.

**Tabela 2:** Amostras clínicas de casos suspeitos de sarampo, coletadas no surto do Ceará (CE) e Pernambuco (PE) encaminhadas ao Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, segundo o tipo de amostra, estado de origem e ano. Brasil, 2013-2015.

Material recebido	2013		2014		2015		Total de casos	
	CE	PE	CE	PE	CE	PE	CE	PE
Soro	-	258	1	15	5	6	6	279
Soro/ SNF	1	100	33	25	-	2	34	127
Soro/ urina	-	14	6	1	7	-	13	15
Soro/ SNF/ urina	-	29	82	9	28	2	110	40
SNF	-	41	-	33	9	-	9	74
Urina	-	17	-	3	5	-	5	20
SNF/ urina	1	12	1	10	5	-	7	22
Total	2	471	123	96	59	10	184	577
	473		219		69		761	

SNF, Secreção Nasofaríngea



**Figura 26:** Quantitativo de amostras clínicas recebidas dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública dos estados de Pernambuco (PE) e Ceará (CE) para serem testadas por técnica sorológica e/ou por técnica de biologia molecular (reação em cadeia da polimerase e genotipagem), Brasil, 2013 a 2015. SNF= Secreção Nasofaríngea

Para a análise filogenética foram utilizadas 28 sequências de casos esporádicos e vacinais detectados dos estados: Distrito Federal (DF), Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG), Paraíba (PB), Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ), Roraima (RR), Santa Catarina (SC) e São Paulo (SP). Uma sequência do genótipo D8 detectada em SP na última semana epidemiológica (SE) de 2012 foi considerada por ter ocorrido casos secundários nas SE do ano seguinte. Na tabela 3, encontra-se o quantitativo das sequências utilizadas por estado e ano.

**Tabela 3:** *Quantitativo das sequências dos casos esporádicos utilizadas para a análise filogenética, Brasil, 2012-2015.* Legenda: DF - Distrito Federal, ES - Espírito Santo, MG - Minas Gerais, PB – Paraíba, PR – Paraná, RJ – Rio de Janeiro, RR – Roraima, SC – Santa Catarina, SP – São Paulo.

<b>Estado</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>Total</b>
<b>DF</b>		2			2
<b>ES</b>		2			1
<b>MG</b>		2			1
<b>PB</b>		8			8
<b>PR</b>		1	1		2
<b>RJ</b>			2		2
<b>RR</b>				1	1
<b>SC</b>		1			1
<b>SP</b>	1	2)	7		10
<b>Total</b>	1	16	10	1	28

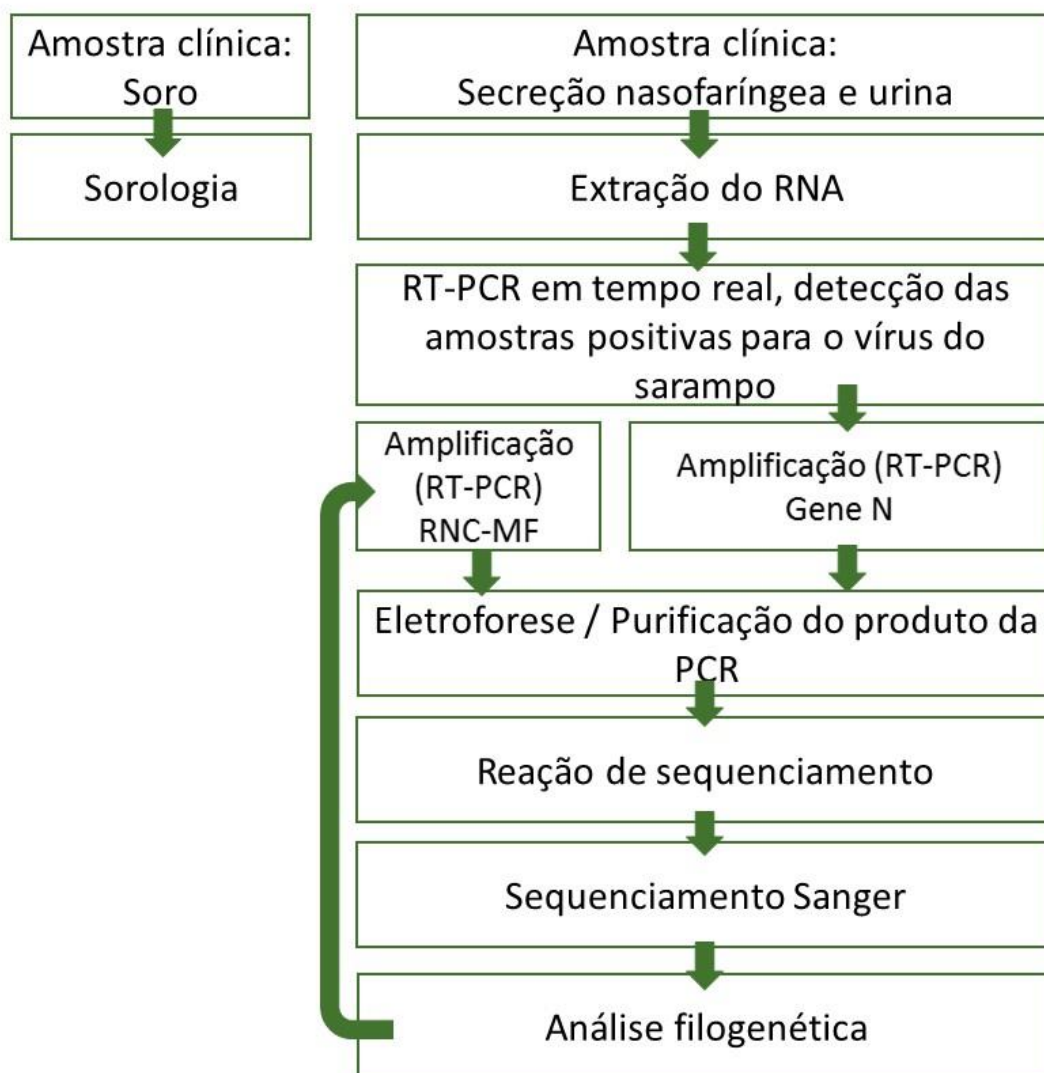
## **4.2 SELEÇÃO DE AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO DA REGIAO NÃO CODIFICANTE ENTRE OS GENE M E F**

Para a realização deste projeto, tivemos como colaborador o Laboratório de Referência Nacional/LRN do Canadá (Instituto Nacional de Microbiologia). Amostras clínicas dos surtos de PE e CE foram enviadas ao Canadá para sequenciamento da região RNC-MF. Os critérios de seleção dessa sub-amostra incluíram: I) o valor do Ct do teste de PCR em tempo real ( $\leq 30$ ), para garantir maior eficiência de amplificação de produtos virais, II) a disponibilidade de volume do material clínico e III) a disponibilidade de informações epidemiológicas tais como, o município de residência e a semana epidemiológica, para garantir uma melhor representatividade geográfica e temporal. Após a análise dos dados, foram selecionadas 80 amostras.

Posteriormente, o protocolo desenvolvido no Canadá foi repassado ao LVR, de modo que testamos 15 amostras adicionais: 7 amostras do surto de CE e PE, 5 de casos esporádicos de sarampo ocorridos em São Paulo (SP), 2 de Paraíba (PB) e 1 do Espírito Santo (ES).

### 4.3 ETAPAS DO ESTUDO

O fluxograma contendo as etapas no desenvolvimento do presente estudo encontra-se ilustrado na figura 27.



**Figura 27:** Fluxograma das metodologias empregadas no estudo.

O quantitativo de amostras testadas, segundo o ensaio laboratorial encontra-se descrito na tabela 4.

**Tabela 4:** Métodos utilizados no Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo nos casos suspeitos de CE e PE 2013-2015.

Metodologia	PE		CE	
	n	%	n	%
Sorologia	279	48	6	3
Sorologia/PCR/ Genotipagem	182	32	157	86
PCR / Genotipagem	116	20	21	11
Total	577	100	184	100

#### 4.4 SOROLOGIA

Os ensaios imunoenzimáticos para detecção qualitativa e determinação quantitativa dos anticorpos específicos contra o vírus do sarampo das classes IgM e IgG no soro humano foram realizados com KitSiemens/dade Behring, Enzygnost® Anti-Masern-Virus/IgM e Enzygnost Anti-Measles Virus/IgG, de acordo com os procedimentos operacionais padrão (POP) descritos nos POP-TE-001 para IgM (LVRS, 2007a) e POP-TE-002 para IgG (LVRS, 2008) e com os respectivos manuais do fabricante. Os anticorpos específicos contidos na amostra de soro ligam-se ao antígeno do vírus nos poços de reação na placa de ensaio. A estes anticorpos específicos fixa-se o conjugado anti/IgG e anti/IgM humano. A porção enzimática do conjugado transforma a solução cromogênica em uma cor azul. Após adição da solução de bloqueio do kit, esta reação termina, alterando a cor para amarelo (LVRS, 2007a, LVRS, 2008 ).

Para a pesquisa de anticorpos IgM, foi adicionado 200µl de tampão diluente de amostra com 10µl de soro na placa de ensaio. A mistura foi diluída 1/2 com o fator reumatoide reconstituído (200µL dos soros diluídos + 200µL do RF reconstituído) e mantido em temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente, foi adicionado 150µl dos controles e amostras previamente diluídas por orifício e em duplicata (antígeno/controle do antígeno). A placa foi vedada com uma película e incubada por 37°C ±2 por 1h. Depois de decorrido o

tempo, foi removida a tampa e realizado o processo de lavagem 3 vezes com solução de lavagem diluída POD, utilizando a lavadora automática de placas Atlantis que remove e realiza a troca dos líquidos dos poços da placa. Ao término do ciclo de lavagem, a placa foi vertida contra uma toalha de papel absorvente para remoção de possíveis restos da solução de lavagem, e em seguida adicionado 100µl do conjugado anti-IgM/POD humano por orifício, seguido de incubação a 37°C ±2 por mais 1h. Após o tempo decorrido, foi repetido o processo de lavagem e adicionado 100µl de substrato (substância cromogênica). A placa foi protegida da luz e incubada a temperatura ambiente por 30 min. Após adição de 100µl da solução de paragem POD, a leitura foi realizada por espectrofotômetro, no comprimento de onda de 450nm (comprimento de onda para medição de referência 650nm). Para cada amostra e controles, foi determinada diferença entre as medidas de absorbância  $\Delta E$  (A antígeno - A controle do antígeno). Com base nos critérios do ensaio, as amostras são classificadas da seguinte forma: as que obtiveram leituras com densidade ótica final menor que 100 são consideradas negativas, as que obtiveram leituras com densidade ótica final maior que 200 são consideradas positivas e aquelas densidade ótica final entre 100 e 200 são consideradas inconclusivas no primeiro momento e devem ser retestadas.

Para a determinação de anticorpos da classe IgG, foi realizada uma diluição, adicionando 200µl de tampão para amostras POD (coloração azul-violeta) e 10µl de soro em um tubo cônico tipo ependorf. Em seguida, com uma pipeta multicanal foi adicionado na placa de ensaio 200µl de Tampão diluente de amostra sem corante e 20µl dos controles e amostras previamente diluídas em cada orifício da placa, a mesma foi vedada com uma película ao final do processo de aplicação das amostras e controles e incubada a uma temperatura de 37°C± 2 por 1h. Depois de decorrido o tempo, foi removida a película e realizado o processo de lavagem 3 vezes com solução de lavagem diluída POD utilizando a lavadora automática de placas (descrita a cima). Ao término do ciclo de lavagem, a placa foi vertida contra uma toalha de papel absorvente para remoção de possíveis restos da solução de lavagem, e em seguida adicionado 100µl do conjugado Anti IgG/POD humano por orifício, vedada novamente e incubada a 37°C ±2 por mais 1h. Após o tempo decorrido foi removido a tampa e repetido o

processo de lavagem e retirada de restos da solução de lavagem com papel absorvente, em seguida foi adicionado 100µl de substrato (solução cromogênica) por orifício, vedado novamente com uma nova película e protegida da luz e incubada a temperatura ambiente por 30 min. Decorridos o tempo foi adicionado 100µl da solução de paragem por orifício e realizado a leitura por fotômetro no comprimento de onda de 450nm. O comprimento de onda recomendado para medição de referência é 650nm. Com base nos critérios do ensaio, as amostras são classificadas de forma quantitativa com a ajuda do método  $\alpha$ , a partir de uma tabela fornecida pelo fabricante do kit.



## **4.5 ENSAIOS MOLECULARES**

### **4.5.1 EXTRAÇÃO DO RNA**

O RNA viral foi extraído utilizando o kit comercial QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha), de acordo com o POP-TC-006 (LVRS, 2010a). O método baseia-se na propriedade de ligação de moléculas de RNA a uma membrana de sílica em gel (coluna de sílica de sílica). Primeiramente, a amostra é lisada sob condições desnaturantes no tampão AVL para inativar RNases e promover a liberação do RNA. Resumidamente, foram adicionados 560µL de Tampão de Lise AVL+ 5,6µL de Carrier/AVE; 140 µL do SNF ou urina. A suspensão foi homogeneizada e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado 560µL de álcool etílico PA à 100%. Após homogeneização, 630µL da mistura foi transferida para uma coluna de sílica previamente identificada com o número interno do LVRS da amostra clínica. Após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm, o eluído do tubo coletor foi desprezado. Um novo tubo coletor foi colocado e os 630µL restantes da mistura foram transferidos para a coluna de sílica. Após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm, o eluído foi descartado e a coluna de sílica transferida para novo tubo coletor. Foram adicionados 500µL do Tampão de lavagem AW1 e após, centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm, o eluído foi descartado. Houve adição de 500µL do Tampão de lavagem AW2 e após centrifugação por 3 minutos a 14000 rpm, o eluído foi descartado. A coluna de sílica foi transferida para novo tubo coletor e após centrifugação por 1 minuto a 14000 rpm, a coluna de sílica foi transferida para um tubo tipo eppendorf de 1,5 ml previamente identificado, sendo adicionados 60µL de Tampão de eluição (AVE) e após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm a coluna de sílica foi descartada e o RNA obtido.

#### 4.5.2 RT-PCR EM TEMPO REAL

Após a extração, o RNA foi submetido à transcrição reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) em único tubo, utilizando o kit SuperScriptIII™ Platinum Taq DNA Polymerase® One-StepQuantitative RT-PCR (Invitrogen). Esse protocolo foi desenvolvido pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças americano (CDC/EUA) e constitui a recomendação da OMS para a amplificação do gene N do vírus do sarampo (Hummel *et al.*, 2006). Os oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise específicas, e a preparação da mistura de reação encontram-se descritos nas tabelas 5 e 6.

Cada RNA extraído foi testado em triplicata para o gene N. Em todas as reações, foi adicionado um controle interno para cada amostra clínica (RNase P humana), controle positivos com concentração alta e baixa do MEV (enviados pelo CDC), controle da mistura, controle positivo da RNaseP (Quantitative PCR Hmn Reference Total RNA, Stratagene) e o controle negativo da extração do RNA (LVRS, 2011a).

**Tabela 5:** Sequência dos iniciadores e sondas específicos para o gene N e gene da RNase P humana da reação de PCR em tempo real para detecção do sarampo desenvolvido pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças americano (CDC/EUA). A sonda foi marcada na 5' terminal com fluoróforo "6-carboxy-fluorescein" (FAM) e no 3' terminal com uma molécula não fluorescente "quencher" (BHQ1 – "black hole quencher-1")

Gene	Iniciadores/sonda	Sequência	Conc.
N	MVN1139 direto	5'-TGGCATCTGAACTCGGTATCAC-3'	0,4µM
	MVN1213 reverso	5'-TGTCCTCAGTAGTATGCATTGCAA-	0,4µM
	MVN1163 sonda	5'-FAM- CCGAGGATGCAAGGCTTGTTCAGA- BHQ-3'	0,25µM
RNaseP	RNP direto	5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3'	0,4µM
	RNP reverso	5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'	0,4µM
	RNP sonda	5'-FAM- TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG- BHQ1-3'	0,1µM

**Tabela 6:** *Protocolo para a reação de qRT-PCR para detecção do gene N do vírus do sarampo, desenvolvido pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças americano (CDC/EUA) (Hummel et al., 2006).*

Reagente	Volume empregado ( $\mu\text{L}$ )
Tampão de reação 2x	12,5
Fluoróforo de referência	0,05
Inibidor de RNase (40U/ $\mu\text{L}$ )	0,25
Mix de enzimas SSIII/Taq	0,5
Iniciador direto (15 $\mu\text{M}$ )	0,5
Iniciador reverso (15 $\mu\text{M}$ )	0,5
Sonda (12.5 $\mu\text{M}$ )	0,5
Água livre de nucleases	7,7
Volume final do mix reação	22,5

A cada orifício da placa foi adicionado um volume de 2,5 $\mu\text{L}$  de RNA, totalizando um volume final de 25 $\mu\text{L}$ . A placa de reação foi submetida a 48° C por 30 minutos (transcrição reversa), seguida por 95° C por 2 minutos (ativação enzimática) e 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto (amplificação), com detecção do sinal de fluorescência ao final de cada ciclo. Foram consideradas positivas amostras cujo valor de Ct foi menor ou igual a 40 (tabela 7).

**Tabela 7:** *Interpretação dos valores do Ct da reação de qRT-PCR para detecção do gene N do vírus do sarampo. Fornecido pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças americano (CDC/EUA).*

Resultado	Gene Alvo	Gene RNase P
Detectável	<40	<40
Detectável	<40	>40 a indeterminado
Não detectável	>40	<40
Inconclusiva	>40	>40

#### 4.5.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE N POR RT-PCR CONVENCIONAL

As amostras com resultado detectável no qRT-PCR foram submetidas à amplificação de fragmento do gene N (634pb, nt 1104 a 1737) por RT-PCR convencional, visando a posterior genotipagem por sequenciamento de Sanger. Inicialmente, as amostras de RNA purificado foram submetidas à reação de RT-PCR de passo único, empregando iniciadores desenvolvidos pelo CDC (tabela 8) (Bankamp *et al.*, 2013). Nesse protocolo foi empregado o kit OneStep RT-PCR (Qiagen, Alemanha), de acordo com o POP-LVRS-TE-029 (LVRS, 2011b). A mistura de reação encontra-se descrita na tabela 9.

Para cada reação foi utilizado um controle negativo da extração e um controle positivo do vírus do sarampo com um inserto de 200 nucleotídeos enviado pelo CDC. A cada mistura da reação foi adicionado um volume de 5µL de RNA purificado totalizando um volume final de 50µL por tubo previamente identificado com número da amostra. As reações foram então submetidas a 50°C/30 min; seguido por 40 ciclos de: 94°C/30 segundos, 55°C/30 segundos, 72°C/30 segundos; e um ciclo final de 72°C/10 minutos.

Na ausência de amplificação pelo protocolo CDC, um segundo protocolo de RT-PCR com iniciadores desenvolvidos pela Saúde Pública Inglaterra/HPE (HPA/Inglaterra) foi utilizado. Este protocolo foi seguido utilizando o POP-LVRS-TE-011 e POP-LVRS-TE-018. Utilizando inicialmente a síntese de DNA complementar (cDNA), com a enzima MMLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) e iniciadores randômicos e a ciclagem 37°C/60 minutos; 95°C/5 minutos no termociclador (tabela 10) (LVRS, 2010b). Os cDNAs foram submetidos à amplificação por PCR e após, um nested PCR com a utilização de um par de iniciador internos. Para assim, obter de um fragmento de 552pb do gene N (LVRS, 2010c). Cada reação foi feita com um par de iniciadores diferentes (tabela 8). As reações, descritas na tabela 11 foram feitas com kit Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e foram submetidas a 95°C/3 min; seguidos por 10 ciclos de 95°C/30 segundos, 57°C/30 segundos, 72°C/60 segundos; seguidos por 20 ciclos de 95°C/30 segundos, 57°C/30 segundos, 72°C/1minuto + 5 segundos; e a seguir 72°C/7 minutos.

**Tabela 8:** Iniciadores empregados em dois diferentes protocolos de PCR para a amplificação do gene N do vírus do sarampo, desenvolvidos pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças americano (CDC/EUA) e Saúde Pública Inglaterra (HPA/Inglaterra).

Protocolo	Iniciador	Sequência	Conc.
CDC	MEV216 direto	5'-TGGAGCTATGCCATGGGAGT-3'	20µM
	MEV214 reverso	5'-TAACAATGATGGAGGGTAGG-3'	20µM
HPA	N1 direto (1ª PCR)	5'-GCTATGCCATGGGAGTAGGA-3'	10µM
	N2 reverso (1ª PCR)	5'-GGCCTCTCGCACCTAGTCTA-3'	10µM
	N3 direto (2ª PCR)	5'-CATGGGAGTAGGAGTGG-3'	25µM
	N4R reverso (2ª PCR)	5'-CTCTCGCACCTAGTCTAG-3'	25µM

**Tabela 9:** Reação de RT-PCR convencional de passo único para amplificação da região C-terminal do gene N do vírus do sarampo, protocolo do Centro de Controle e Prevenção de Doenças americano (CDC/EUA) (Bankamp et al., 2013).

Reagentes	Volume (µL)
Tampão One-Step RT-PCR (5x)	10,0
dNTP (10mM)	2,0
Iniciador direto MEV 216 (20µM)	1,5
Iniciador reverso MEV 214 (20µM)	1,5
Mix de enzimas (10x)	2,0
Inibidor de RNase (40U/µL)	0,5
Água livre de nucleases	22,5
Volume final da mistura	45,0

**Tabela 10:** *Protocolo da Saúde Pública Inglaterra/HPE (HPA/Inglaterra) para reação de transcrição reversa com a enzima MMLV.*

Reagentes	Volume (µL)	Conc. final
Tampão de transcrição reversa (10x)	5	1x
dNTP (10mM)	1	0,4mM
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5	0,6µM
Iniciador randômico (3µg/µL)	0,5	0,6µM
Enzima M-MLV RT (200U/µL)	1	4U/µL
Inibidor de RNase (40U/µL)	0,5	0,4U/µL
Água livre de nucleases	20,5	-
Volume final da mistura	30	-

**Tabela 11:** *Protocolo da Saúde Pública Inglaterra/HPE (HPA/Inglaterra) para amplificação da região C-terminal do gene N do vírus do sarampo.*

Primeira PCR			Segunda PCR		
Reagentes	Vol		Reagentes	Vol	
Tampão PCR (10x)	5	1x	Tampão PCR (10x)	5	1x
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5	1,5mM	MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5	1,5mM
dNTP (10mM)	1	0,2mM	dNTP (10mM)	1	0,2mM
N1 direto (10µM)	1	0,2µM	N3 direto (25µM)	1	0,5µM
N2 reverso (10µM)	1	0,2µM	N4R reverso	1	0,5µM
TaqPolimerase (5U/µL)	1	0,5U/µL	Taq Polimerase	1	0,5U/µL
Água livre de nucleases	20,5	-	Água livre de	30,5	-
Volume final	31	-	Volume final	41	-

### 4.5.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO RNC-MF POR RT-PCR

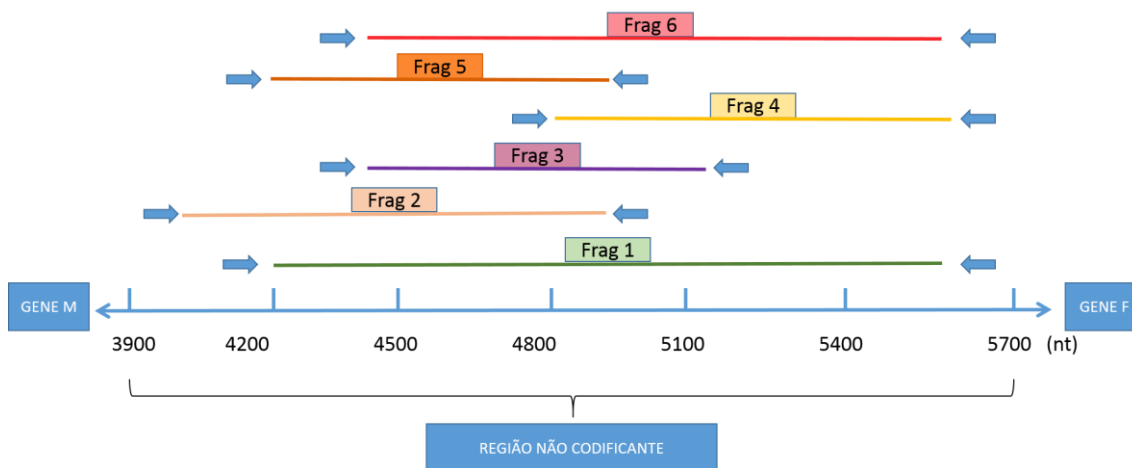
As 80 amostras clínicas enviadas ao Instituto Nacional de Microbiologia/ Canadá foram submetidas à amplificação de fragmentos gênicos da região RNC-MF do MEV com o painel de iniciadores descritos na tabela 12 (Gardy *et al.*, 2015; Penedos *et al.*, 2015). As reações para todos os fragmentos foram realizadas com kit OneStep RT-PCR (Qiagen, Alemanha), sob as seguintes condições: 50°C por 30 minutos, 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos, 68°C por 90 segundos e 74°C por 10 minutos.

**Tabela 12:** *Iniciadores empregados para a amplificação (20µM) (RT-PCR) e sequenciamento (3,2µM) da região não codificante entre os genes M e F do vírus do sarampo.*

Iniciador	Sequência do iniciador	Tamanho do amplicon
4200F	GGCACCAGTCTTCACATTAG	1409 (Fragmento 1)
5609R	CGAGTCATAACTTTGTAGCTTGC	
3940F	GATCAATTCTTTGCACAGTTTAGGT	886 (Fragmento 2)
4826R	GTTGGGTCACCTCGGTTCG	
4409F	CATAAATGATGACCAAGGAC	736 (Fragmento 3)
5145R	GGTTGCCGTGGTTCGTGTGTG	
4801F	CACAAGCGACCGAGGTGAC	808 (Fragmento 4)
5609R	CGAGTCATAACTTTGTAGCTTGC	
4200F	GGCACCAGTCTTCACATTAG	626 (Fragmento 5)
4826R	GTTGGGTCACCTCGGTTCG	
4409F	CATAAATGATGACCAAGGAC	1200 (Fragmento 6)
5609R	CGAGTCATAACTTTGTAGCTTGC	

Utilizando o protocolo cedido pelo Dr Alberto Severini (Instituto Nacional de Microbiologia/ Canadá), 15 amostras do genótipo D8 foram testadas no LVRS: 7 amostras do surto de CE e PE, 8 amostras de casos esporádicos que ocorreram no Brasil no mesmo período. O protocolo original preconizava a amplificação dos 4 primeiros fragmentos da tabela a cima. No LVRS, após análise dos iniciadores da região RNC-MF, duas novas combinações de

iniciadores foram realizadas na RT-PCR (fragmentos 5 e 6) (FIGURA 28). As 15 amostras brasileiras de 2012-2015 foram testadas para os 6 fragmentos da RNC-MF.



**Figura 28:** Fragmentos amplificados e sequenciados para a caracterização da região não codificante entre os genes M e F. As setas azuis representam os iniciadores de cada fragmento.

#### 4.5.4 PROCEDIMENTOS PÓS-PCR

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com GelRed (Biotium), e observados com um transiluminador UV (Lvrs, 2007b). Os amplicons foram retirados do gel com uma lâmina e foram purificados com kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Alemanha) (LVRS, 2010d). O kit foi utilizado para extração e purificação das moléculas de DNA viral por coluna de sílica. Os fragmentos no gel de agarose contendo o DNA foram dissolvidos em um tampão que ajusta o pH da solução para 7,5 para a ligação dos ácidos nucléicos na sílica. As impurezas foram retiradas durante o processo de lavagem com um tampão de baixa força iônica contendo etanol e o DNA foi posteriormente eluído em um tampão de eluição fornecido no kit. O DNA purificado foi utilizado para a reação de sequenciamento.

#### 4.5.5 SEQUENCIAMENTO DE SANGER

Para cada produto de DNA purificado, foi preparado uma mistura para ambas as direções do DNA, utilizando o kit Big Dye sequencing kit versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA), tampão 5X e o produto Big Dye® v3.1, os iniciadores



diretos e reversos (na concentração de 3,2pmol/μl), e água com grau para biologia molecular livre de nucleases, segundo o POP-LVRS-TC-007 (LVRS, 2010e). Após a reação, o produto foi submetido à purificação por precipitação em isopropanol a 75%, segundo o POP-LVRS-TC-018 (LVRS, 2012) e ressuspenso em Formamida (Hi-Di™ Formamide Applied Biosystems, EUA). Seguido por choque térmico a 95° C por 3 minutos e banho de gelo. Os fragmentos da região C-terminal do gene N e da RNC-MF foram analisados no sequenciador ABI 3130xl (Applied Biosystems, EUA).

#### 4.5.6. ANÁLISE FILOGENÉTICA

As sequências consenso dos fragmentos (“contigs”) foram montadas e editadas, utilizando o programa Sequencher™ 5.1 (Gene Codes Corporation, EUA) (tabela 4- 4).

As sequências obtidas do MEV do fragmento do gene N foram nomeadas segundo a orientação oficial da OMS (OMS, 2012). Entretanto, para facilitar a identificação das sequências nas análises realizadas nesse estudo, elas foram renomeadas com o município de origem, seguido por estado e país. Exemplo: MMeV/Pernambuco.BRA/13.13 (nomenclatura oficial da OMS) foi renomeada como MMeV/Olinda\_PE.BRA/13.13 (nomenclatura utilizada nesse estudo).

Todas as sequências obtidas do gene N foram submetidas aos bancos de dados GenBank/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.gov>) e/ou MeaNS (<http://www.WHO-measles.org/>), sob os números de acesso listados no anexo 10.2.

Para a análise do gene N foram utilizadas as sequências brasileiras sob análise (2012 a 2015); sequências de referência da OMS e sequências representativas de outros países - no período investigado -, disponíveis no GenBank/NCBI. Para reduzir a quantidade de sequências e manter a representatividade da diversidade genética na árvore filogenética agrupamos sequências 100% idênticas do gene N do MEV, com o programa Bioedit 7.2, de acordo com a cidade de coleta (anexo 10.3). Nomeamos as sequências representativas como: Número de sequências agrupadas, seguido pelo município de origem e o período de semanas epidemiológicas em que identificamos a sequência.

Para a análise da região RNC-MF, foram escolhidas as sequências representativas, com base no município de origem dos surtos nos estados de PE e CE (2013-2015), uma sequência do caso esporádico de SP, sequências disponíveis no GenBank/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.gov>) e sequências não publicadas pelo Laboratório de Referência Nacional em Sarampo do Canadá. As sequências da RNC-MF serão disponibilizadas no GenBank, após a publicação do artigo.

Os conjuntos de sequências foram alinhados utilizando o programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1997), ferramenta integrada no pacote MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Para a reconstrução das árvores filogenéticas do gene N e região RNC-MF utilizamos o método de máxima verossimilhança (MV) (PHYML) (Guindon e

Gascuel, 2003), com o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros (Kimura, 1980) e Tamura Nei 93 (Tamura e Nei, 1993), respectivamente, e conforme determinado previamente com o programa JModeltest v2.1.7 (Posada, 2008). As árvores filogenéticas foram visualizadas/editadas com o programa Mega 6.0/ Figtree 1.4.0 (Rambaut, 2006).

#### 4.5.7 ANÁLISE BAYESIANA DA REGIÃO NÃO CODIFICANTE ENTRE OS GENES M E F (GENOTIPO D8)

Para a análise bayesiana, utilizamos o pacote Beast v1.8.4 (Drummond e Rambaut, 2007) incluindo as nossas sequências e sequências da região RNC-MF (genótipo D8), depositadas no GenBank/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.gov>), bem como as sequências do Canadá ainda não publicadas e gentilmente cedidas por aquele laboratório. A estrutura temporal das sequências analisadas foi observada através do programa Tempest v.1.5.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tempest/>).

Diferentes modelos demográficos foram testados (“Birth Death Skyline Serial, Coalescent Constant Population, Coalescent Exponential Population e Coalescent Extended Bayesian Skyline) e os valores indicaram que o “*Coalescent Bayesian Skyline*” foi o modelo que melhor se ajustou. Além deste, outros parâmetros iniciais de análise foram incluídos: a) data de início do exantema; b) modelo de substituição nucleotídica Tamura Nei 93 + Gamma (estimado pelo programa JModeltest v2.1.7 (Posada, 2008); c) relógio molecular relaxado (lognormal) (Thorne *et al.*, 1998).

A análise contemplou uma cadeia final de 20.000.000 gerações (com amostragem a cada mil gerações). A convergência foi avaliada pela análise de dimensão mínima efetiva da amostra para cada parâmetro (ESS, do inglês *effective sample size*), após a exclusão de 10% dos valores iniciais (*burn in*) (Tracer v1.6 (Rambaut *et al.*, 2003). Os parâmetros com valores de ESS >200 foram considerados satisfatórios. Para cada parâmetro, as incertezas de medição foram analisadas com base no intervalo de confiança de 95% dos valores de densidade posterior (HPD, do inglês Highest Posterior Density). A árvore filogenética de máxima credibilidade (MCC, do inglês Maximum Clade Credibility) foi selecionada e anotada, utilizando o programa TreeAnnotator, parte do pacote Beast v.1.8.4 (Drummond *et al.*, 2012) e visualizada com o programa FigTree v1.4.0 (Rambaut, 2006).

**Tabela 13:** Sequências de referência dos genótipos do sarampo da Organização Mundial da Saúde (OMS).

<b>Genótipo</b>	<b>Circulação</b>	<b>Cepa de referência</b>	<b>Número de acesso - Genbank</b>
A*	Ativa	Edmonston-wt.USA/54	U01987
B1	Inativa	Yaounde.CAE/12.83	U01998
B2	Ativa	Libreville.GAB/84	U01994
B3	Ativa	NSE York.USA/94	L46753
		Ibadan.NIE/97/1	AJ232203
C1	Ativa	Tokyo.JPN/84/K	AY043459
C2	Ativa	Maryland.USA/77	M89921
		Erlangen.DEU/90	X84872
D1	Inativa	Bristol.UNK/74	D01005
D2	Ativa	Johannesburg.SOA/88/1	U64582
D3	Ativa	Illinois.USA/89/1	U01977
D4	Ativa	Montreal.CAN/89	U01976
D5	Ativa	Palau.BLA/93	L46758
		Bangkok.THA/93/1	AF079555
D6	Ativa	NSE Jersey.USA/94/1	L46750
D7	Ativa	Victoria.AUS/16.85	AF243450
		Illinois.USA/50.99	AY037020
D8	Ativa	Manchester.UNK/30.94	AF280803
D9	Ativa	Victoria.AUS/12.99	AF481485
D10	Ativa	Kampala.UGA/51.00/1	AY923185
D11	Ativa	MVi/Menglian.Yunnan.CHN/47.09	GU440571
E	Inativa	Goettingen.DEU/71	X84879
F	Inativa	MMeV/Madrid.SPA/94 SSPE	X84865
G1	Inativa	Berkeley.USA/83	U01974
G2	Ativa	Amsterdam.NET/49.97	AF171232
G3	Ativa	Gresik.INO/17.02	AY184217
H1	Ativa	Hunan.CHN/93/7	AF045212
H2	Ativa	Beijing.CHN/94/1	AF045217

\*Cepa vacinal

**Tabela 14:** Número de acesso e cepas de vírus do sarampo D8 disponíveis no GenBank utilizadas na construção do conjunto de dados para as análises filogenéticas.

<b>Número de acesso GenBank</b>	<b>Cepa</b>
FJ765078	MVi/Villupuram.Ind/03.07 <sup>1</sup>
KF683445	MMeV/Frankfurt-Maine.DEU/17.11 <sup>1</sup>
JX486001	MVi/Hulu-Langat.MYS/26.11 <sup>1</sup>
JX984461	MMeV/Taunton.GBR/27.12 <sup>1</sup>
KF214761	MMeV/Swansea.GBR/4.13 <sup>1</sup>
JH973033	MVi/Harare.ZWE/38.09 <sup>1</sup>
KF715455	MMeV/Frejus.FRA/20.13/2 <sup>1</sup>
KJ690781	MMeVZuid-HollandZuid.NLD11.14 <sup>1</sup>
KU258342	MMeVPavia.ITA14.14 <sup>1</sup>
KT732261	MMeV/Manchester.GBR/30.13 <sup>2</sup>
KT732233	MMeV/Sheffield.GBR/32.12 <sup>2</sup>
KT732234	MMeV/Sheffield.GBR/32.12/3 <sup>2</sup>
KT732237	MMeV/Gloucester.GBR/46.12 <sup>2</sup>
KT732238	MMeV/Gloucester.GBR/46.12/2 <sup>2</sup>
KT732240	MMeV/Hull.GBR/47.12 <sup>2</sup>
KT732241	MMeV/Derby.GBR/47.12 <sup>2</sup>
KT732243	MMeV/Teeside.GBR/9.13/5 <sup>2</sup>
KT732244	MMeV/Teeside.GBR/9.13/3 <sup>2</sup>
KT732256	MMeV/Lincoln.GBR/15.13 <sup>2</sup>
KT732253	MMeV/Teeside.GBR/16.13/6 <sup>2</sup>
KT732254	MMeV/NewcastleuponTyne.GBR/16.13 <sup>2</sup>
KT732258	MMeV/Teeside.GBR/18.13/2 <sup>2</sup>
KT732235	MMeV/Coventry.GBR/40.12 <sup>2</sup>
KT732236	MMeV/Coventry.GBR/42.12/2 <sup>2</sup>
KT732239	MMeV/Crewe.GBR/46.12 <sup>2</sup>
KT732242	MMeV/Exeter.GBR/52.12 <sup>2</sup>
KT732245	MMeV/Swansea.GBR/9.13 <sup>2</sup>
KT732247	MMeV/Swansea.GBR/10.13 <sup>2</sup>
KT732248	MMeV/Swansea.GBR/13.13/4 <sup>2</sup>
KT732249	MMeV/Swansea.GBR/15.13 <sup>2</sup>
KT732250	MMeV/Swansea.GBR/14.13/4 <sup>2</sup>
KT732251	MMeV/Swansea.GBR/16.13/2 <sup>2</sup>
KT732252	MMeV/Taunton.GBR/15.13 <sup>2</sup>
KT732257	MMeV/Swansea.GBR/17.13/9 <sup>2</sup>

KT732259	MMeV/London.GBR/21.13 <sup>2</sup>
KT732260	MMeV/London.GBR/20.13/2 <sup>2</sup>
KT732231	MMeV/London.GBR/22.12/3 <sup>2</sup>
KJ410048	MVi/Muenchen.DEU/19.13 <sup>2</sup>
KT732232	MMeV/London.GBR/28.12 <sup>2</sup>
KT732246	MMeV/Teeside.GBR/9.13/4 <sup>2</sup>
KT732230	MMeV/Llandudno.GBR/7.12/2 <sup>2</sup>
JN635407	MVi/Texas.USA/4.07 <sup>2</sup>
JN635404	MVi/Virginia.USA/15.09 <sup>2</sup>
KU728743	MMeV/DongThap.VNM/08.14 <sup>2</sup>
KU728742	MMeV/DongThap.VNM/06.14 <sup>2</sup>

---

<sup>1</sup>Sequência utilizada na reconstrução filogenética da análise do gene N do vírus do sarampo, 2007-2014 (Figura 32);

<sup>2</sup>Sequência utilizada na reconstrução filogenética do gene N e da análise da região não codificante entre os genes M e F, 2007-2014 (Figura 5-9, 5-10 e 5-11)

#### **4.6 ASPECTOS ÉTICOS**

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética da FIOCRUZ com o número 68118417.6.0000.5248 (anexo10-1). As amostras investigadas foram coletadas no escopo do Programa de Vigilância epidemiológica de sarampo, em atendimento à Portaria SMEV/MS nº 204 de 17 de fevereiro de 2016, que lista as doenças, agravos e eventos de notificação compulsória (Ministério da Saúde, 2016).

Ainda, as amostras clínicas foram codificadas, de modo que apenas o número de registro de entrada no banco de dados do LVRS torna-se acessível, visando manter a confidencialidade do paciente, em consonância com o Sistema da Qualidade adotado pelo LVRS, com base na norma ISO ABNT 15189.



## 5. RESULTADOS

O diagnóstico laboratorial dos casos suspeitos de sarampo é realizado nos LACEN's por sorologia. Todos os casos com o resultado de detecção reagente ou inconclusivo para IgM, rotineiramente, devem ser encaminhados para o Laboratório de Referência Nacional para Sarampo e Rubéola (LVRS, IOC, Fiocruz). Embora seja esta a recomendação do Ministério da saúde, nem todos os casos são encaminhados para o LVRS por diversos motivos, dentre eles a falta de oportunidade da coleta do material clínico.

Durante os surtos de PE e CE (2013-2015), foi recebido no LVRS material clínico de 761 indivíduos com suspeita de sarampo para serem testados para sorologia e biologia molecular juntamente com a ficha de notificação epidemiológica para o sarampo de cada paciente. Nem todos os casos apresentaram as informações completas na ficha epidemiológica.

### 5.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

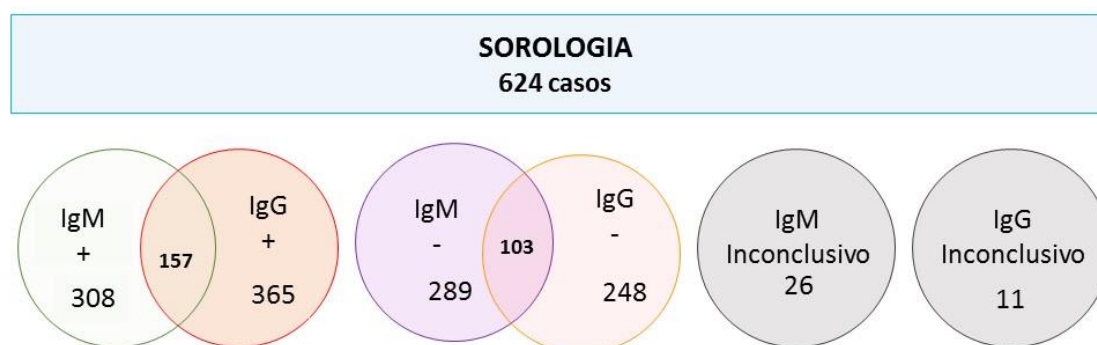
No surto de PE, foram recebidos 577 casos suspeitos no LVRS. Dentre esses, 226 foram confirmados no período de 2013 a 2014 por exames laboratoriais e 59% dos casos confirmados foram genotipados. No surto de sarampo no estado do CE foram confirmados 1052 casos (Lemos *et al.*, 2017). Recebemos no LVRS, 184 casos suspeitos referente a esse surto.

Do total das amostras estudadas, 76% foram do surto de PE e 24% do surto de CE. Dos casos recebidos, 51% eram do sexo feminino e 49% eram do sexo masculino. A idade dos indivíduos variou de 15 dias a 68 anos de idade. Em relação a faixa etária, 38% e 32% correspondiam a <1 ano e de 1 a 5 anos, respectivamente.

## 5.2 SOROLOGIA

Um total de 624 amostras submetidas à sorologia para a detecção de anticorpos IgM e IgG para o vírus do sarampo. Dentre elas, 49% (n=308) dos casos apresentaram resultados reagentes, indicando infecção ou vacinação recente e 50% (n=315) apresentaram resultado não reagente ou inconclusivo para anticorpos IgM.

A maioria das amostras testadas apresentou anticorpos IgG (n=365, 59%) e as demais (n=259, 41%) apresentaram resultados não reagentes inconclusivos (figura 29). Em um dos casos suspeitos, o volume da amostra de soro foi suficiente apenas para a realização da detecção de IgG.



**Figura 29:** Figura esquemática dos resultados dos testes sorológicos para detecção de anticorpos IgM e IgG das amostras clínicas de soro coletados nos surtos de sarampo, ocorridos em Pernambuco e Ceará, Brasil, 2013-2015. Legenda: (+) Resultados reagentes (-) resultados não reagentes.

### 5.3 ANALISE COMPARATIVA ENTRE A DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGM PARA O VIRUS DO SARAMPO E DETECÇÃO VIRAL POR PCR EM TEMPO REAL

Dos 761 casos suspeitos de sarampo, 339 amostras clínicas foram utilizadas para a análise comparativa entre a detecção de anticorpos IgM para o vírus do sarampo e a detecção viral por PCR em tempo real. Os resultados encontram-se apresentados na tabela 15.

**Tabela 15:** Resultados de detecção de IgM e detecção viral das amostras recebidas (simultaneamente) para as técnicas de sorologia e reação em cadeia da polimerase em tempo real.

RT-PCR em tempo real (MEV)	Detecção de anticorpos anti-sarampo IgM			Total
	(+)	(-)	Inconclusivos	
(+)	236	13	9	258
(-)	18	59	4	81
Total	254	72	13	339

Das amostras IgM positivas (n=254) a detecção viral por RT-PCR em tempo real pode ser observada em 236 amostras (92,9%). Em 22 casos (8,5%) que apresentaram resultados de IgM não reagentes (n=13) ou inconclusivo (n=9), foram obtidos resultados positivos na detecção viral.

### 5.4 DETECÇÃO VIRAL POR RT-PCR EM TEMPO REAL

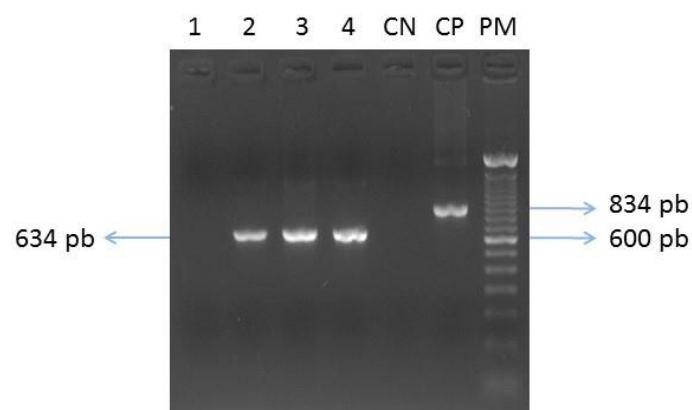
Do total de 476 amostras de SNF e urina submetidas à reação de RT-PCR em tempo real (gene N), 277 (58%) foram positivas, apresentando curvas de amplificação (tabela 16).

**Tabela 16:** Detecção do vírus do sarampo por reação em cadeia da polimerase em tempo real das amostras clínicas de secreção nasofaríngea e urina coletadas nos surtos de sarampo, ocorridos em Pernambuco e Ceará. Brasil, 2013-2015.

UF	Detecção viral (MEV)				Total	%
	Neg	%	Pos	%		
PE	164	55%	134	45%	298	63%
CE	35	20%	143	80%	178	37%
Total	200	42%	277	58%	476	100,0%

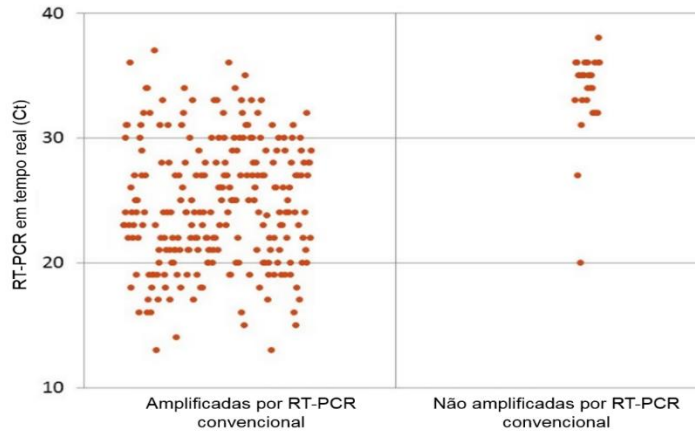
## 5.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA REGIÃO C-TERMINAL DO GENE N

Conforme a recomendação da OMS (OMS, 2012), as amostras positivas no ensaio de qRT-PCR foram submetidas à amplificação de um fragmento da região hipervariável do gene N do MEV (C-Terminal, 1104-1737- tamanho de 634 pb) por RT-PCR convencional, com o objetivo de classificação do genótipo viral por sequenciamento de Sanger (LVRS, 2010e). Das 277 amostras positivas por qRT-PCR, oriundas dos surtos do CE e PE, 125 e 119 respectivamente, 88% produziram amplicons (figura 30) no RT-PCR convencional e foram submetidas à genotipagem. Observamos que, a maioria das amostras que não apresentaram amplificação no RT-PCR convencional apresentaram Ct acima de 35 no RT-PCR em tempo real (figura 31).



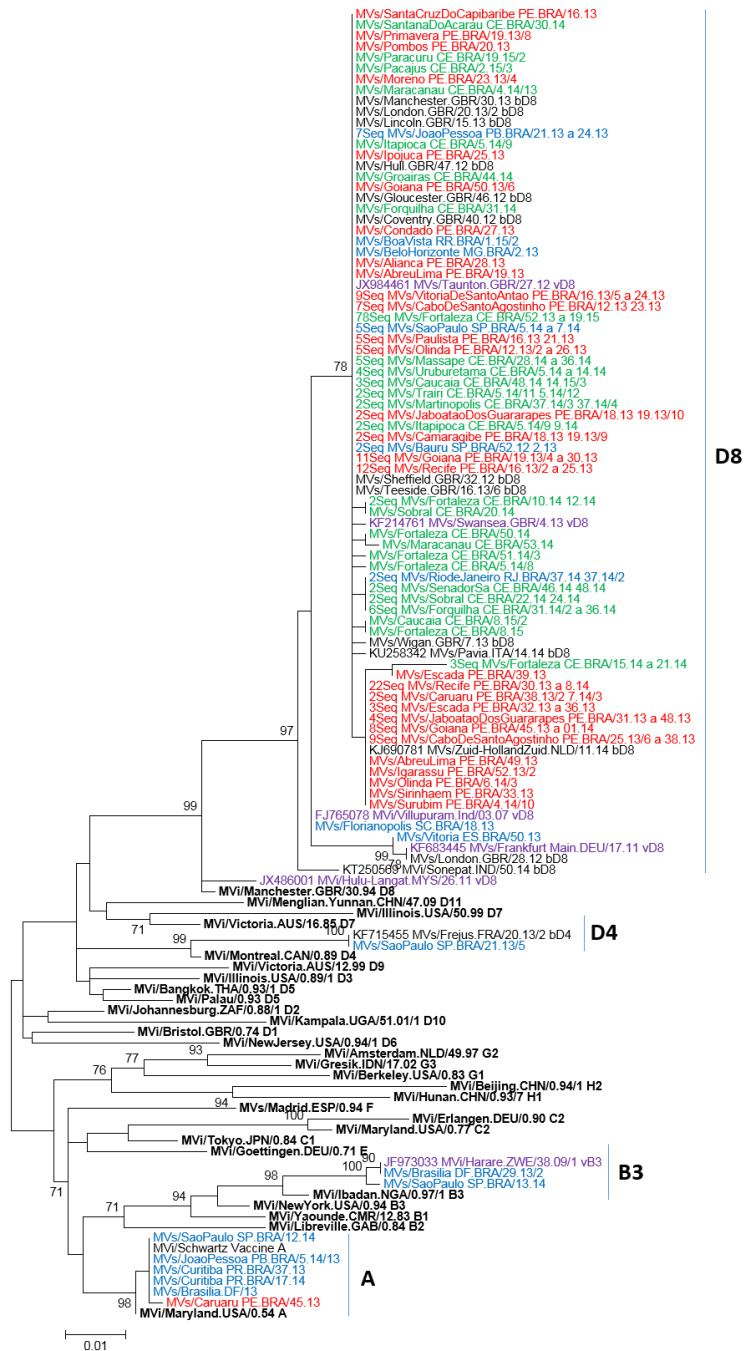
Sigla	Material	Resultado
1	Amostra clínica 1	Negativo
2	Amostra clínica 2	Positivo – 634 pb
3	Amostra clínica 3	Positivo – 634 pb
4	Amostra clínica 4	Positivo – 634 pb
CN	Controle Negativo	Negativo
CP	Controle Positivo	Positivo – 834 pb

**Figura 30:** Produtos da amplificação do gene N do vírus do sarampo, obtidos por reação de RT-PCR convencional (para genotipagem, protocolo CDC) e visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2%. Legenda: CN – Controle negativo; CP – Controle positivo; PM – Padrão de peso molecular; pb - pares de bases.



**Figura 31:** Amplificação do vírus do Sarampo por reação de RT-PCR convencional (protocolo CDC), segundo os valores de Ct obtidos por RT-PCR em tempo real. Das 277 amostras positivas, 243 (88%) produziram amplicons.

Ao longo do período do estudo (2012-2015) foram analisadas 272 sequências da região hipervariável do gene N do MEV dos surtos de PE e CE (n=243) e dos casos esporádicos e vacinais identificados dos estados brasileiros no período do estudo. A reconstrução filogenética destas amostras juntamente com sequências de referência de genótipos previamente caracterizados pela OMS revelou a identificação de quatro genótipos: B3, D4, D8 e A (Figura 32). Embora a primeira sequência do genótipo D8 ter sido identificada na última semana do ano 2012, esta foi considerada devido a este caso ter gerado casos secundários identificados em janeiro de 2013. A proporção da detecção dos genótipos ao longo dos anos pode ser observada na Figura 33.

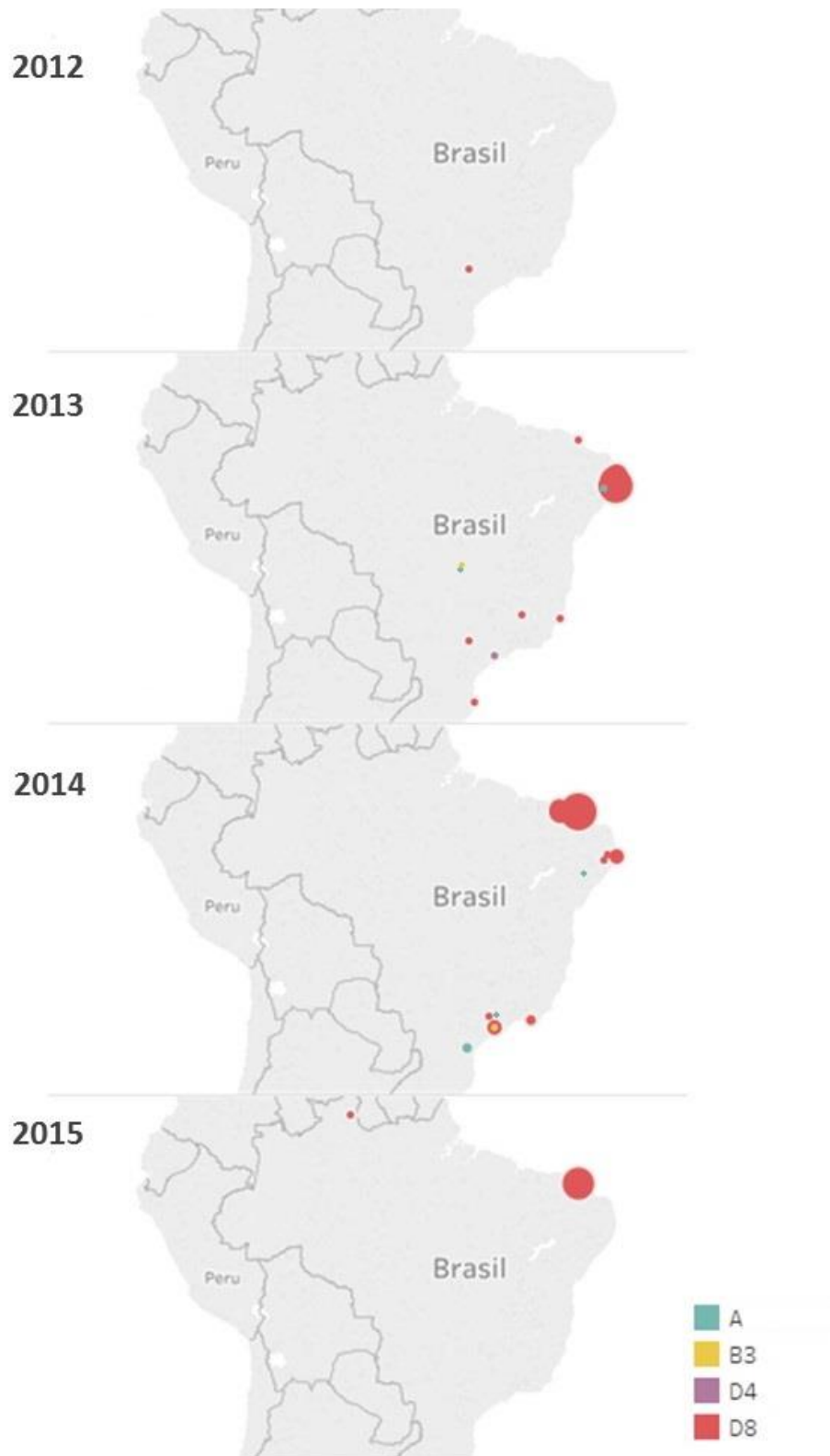


**Figura 32:** Reconstrução filogenética de 119 sequências do gene *N* do vírus do Sarampo (452nt), incluindo sequências circulantes no Brasil (2012-2015), sequências de referência da OMS e sequências representativas de outros países. A reconstrução filogenética foi realizada pelo método de máxima verossimilhança, utilizando Kimura 2 parâmetros + G, como modelo de substituição de nucleotídeos. As sequências do surto do Ceará encontram-se indicadas em verde; do surto de Pernambuco, em vermelho; as sequências dos casos esporádicos e vacinais ocorridos em outros estados brasileiros, em azul; as variantes dos genótipos, em lilás; as sequências de referência da OMS e as sequências representativas dos outros países baixadas do GenBank encontram-se em preto. Sequências brasileiras 100% idênticas foram agrupadas e representadas por uma única sequência representativa. A relação completa encontra-se descrita no anexo 10.3.

Para o gene N, o conjunto de dados analisados contemplou: a) 272 sequências brasileiras de sarampo do período de 2012 a 2018. As sequências de D8 foram dos surtos de PE e CE (243 sequências) e de casos esporádicos (20 sequências) dos estados São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Santa Catarina (SC), Paraíba (PB), Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ) e Roraima (RR), 2 sequências do genótipo B3 do Distrito Federal (DF) e SP, uma sequência do genótipo D4 (SP) e 6 sequências do genótipo A; b) 28 sequências de referências dos genótipos da OMS (Tabela 13) e c) 19 sequências do gene N do genótipo D8 obtidas na base de dados GenBank (Tabela 14).

As sequências idênticas do gene N do genótipo D8 foram agrupadas e 30 sequências D8 consenso representativas foram mantidas para cada município. A relação das sequências D8 consenso e as sequências idênticas representadas para os 450 nucleotídeos do gene N estão descritas no anexo 10.3. Do surto de PE, foram 15 sequências únicas e 14 sequências representativas. Do surto do CE, 14 sequências únicas e 12 sequências representativas foram mantidas. Em relação aos casos esporádicos, foram incluídas sequências de PB e RJ (uma sequência cada) e SP (duas sequências).

Com base na análise filogenética, foi possível identificar casos vacinais e dois grupos de genótipos B e D em diferentes estados (figura 33), com três genótipos identificados: B3, D4 e D8. Entre 2013 e 2014, foram observados casos esporádicos dos genótipos D8, B3 e D4, associados à história de viagens para áreas endêmicas. Em 2015, foi identificada a circulação exclusiva do genótipo D8.



**Figura 33:** Distribuição dos casos esporádicos e surtos detectados nos estados brasileiros de acordo com os genótipos identificados pelos anos (dentro das semanas epidemiológicas 53.2012 a 26.2015). O tamanho do círculo é proporcional ao número de casos reportados.



Entre os genótipos detectados, o genótipo D8 foi o mais prevalente (96,6%) ao longo dos anos de estudo, sendo este o genótipo responsável pelos surtos que apresentaram longa duração nos estados de Pernambuco (2013-2014) e Ceará (2013-2015). Casos esporádicos relacionados à histórico de viagens para áreas endêmicas também foram reportados durante o estudo e estes foram identificados como genótipos D8 (20/272, 7, %), B3 (2/272, 0,73%) e D4 (1/272, 0,36%). Além destes detectamos 6 (2,2%) casos vacinais, todos reportando vacinação recente.

Na árvore filogenética, o ramo com a sequência do caso esporádico D4 (MMeV/SaoPaulo.BRA/21.13/5) apresentou suporte de 99% de bootstrap, como pode ser observado na figura 32. Em comparação a cepa de referência D4 da OMS (MVi/Montreal.CAN/89) a amostra apresentou 5 substituições de aminoácido não sinônimas (tabela 17) e foi verificado 100% de identidade com a cepa nomeada MMeV/Manchester.GBR/10.09 na consulta da base de dados Means, para pesquisa de cepas correspondente reportadas. Constavam na base de dados um total de 49 sequências idênticas a ela reportadas do ano 2013. Entre estas, da semana epidemiológica anterior a ocorrência desse caso (20.13) os países que reportaram foram a Itália, Ucrânia e Irlanda.

**Tabela 17:** Substituição de aminoácidos da sequência do gene N do vírus do sarampo do caso esporádico detectado em São Paulo (2013), em relação a cepa de referência D4 da OMS (MVi/Montreal.CAN/89)

Cepas	Numeração de aminoácidos Gene N				
	443	462	469	475	515
<b>Mvi/Montreal.CAN/89_D4</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>P</b>
MMeV/SaoPaulo.BRA/21.13/5	G	V	I	V	S

A, Alanina; G, Glicina; I, Isoleucina; P, Prolina; S, Serina; T, Treonina; V, Valina

Na árvore filogenética, o ramo com a sequência dos casos esporádicos B3 (MMeV/DistritoFederal.BRA/29.13/2 e MMeV/SaoPaulo.BRA/13.14) apresentou suporte de 98% de bootstrap, como pode ser observado na figura 32. Em comparação a cepa de referência B3 da OMS (MVi/Ibadan.NGA/0.97) as amostras apresentaram de 4-6 substituições de aminoácido não sinônimas (tabela 18). A sequência detectada no DF apresentou 100% de identidade com a cepa nomeada MVi/Harare.ZWE/38.09 e a sequência de SP não teve nenhuma sequência idêntica a ela, na consulta da base de dados MeaNS. Nestes casos esporádicos, houve

relato de viagens internacionais. O indivíduo do DF esteve em viagem à África do Sul e Etiópia dias antes da manifestação da doença e o indivíduo de SP relatou viagem para Itália, Reino Unido, Irlanda, Holanda e Bélgica no período de infecção.

**Tabela 18:** Substituições de aminoácidos das sequências do gene N do vírus do sarampo dos casos esporádicos detectados no Brasil, 2013-2014, em relação a cepa de referência B3 da OMS (MVi/ Mvi/Ibadan.NIE/97/1).

Cepas	Numeração de aminoácidos Gene N					
	427	443	455	462	532	537
<b>Mvi/Ibadan.NIE/97/1</b>	N	S	G	A	N	R
MMeV/DistritoFederal.BRA/29.13/2	S	N	E	V	D	C
MMeV/SaoPaulo.BRA/13.14	S	N	E	V	-	-

A, Alanina; C, Cisteína; D, Aspartato; E, glutamato; G, Glicina; N, Asparagina; R, arginina; S, Serina; T, Treonina; V, Valina

As sequências do surto do PE divergiram 2,2% a 2,4% (10-11 substituições de nucleotídeos) e as sequências do surto do CE divergiram 2,2% a 3,1% (10-14 substituições de nucleotídeos), quando comparadas com a sequência de referência D8 (MVi/Manchester.GBR/30.94) da OMS. As substituições de nucleotídeos das em sequências dos surtos do CE e PE foram as a1254g, g1305a, t1383c, c1361t, t1383c, a1404g, c1446t, c1500t e a1564g (Tabela 19).

Entre as amostras D8 brasileiras analisadas dos surtos de PE e CE e dos casos esporádicos, encontramos de duas a cinco substituições de aminoácidos (aa) não sinônimas (tabela 19) quando comparamos com a sequência de referência D8 (MVi/Manchester.UNK/30.94). As alterações dos aa foram da Treonina para Isoleucina (T454I) e Asparagina para Aspartato (N522D). Das 117 sequências analisadas do surto de PE, 116 apresentaram as duas substituições citadas e uma sequência do município Escada (MMeV/Escada\_PE.BRA39.13) apresentou uma substituição de nucleotídeo de T para C na posição 1399 que alterou uma Leucina para Prolina (L467P).

Do surto de CE, 103 sequências apresentaram apenas as alterações T454I e N522D e em 21 sequências analisadas, além destas 2 alterações, mais 9 mutações de aa não sinônimas foram identificadas.

Filogeneticamente, as cepas D8 brasileiras dos surtos e casos esporádicos agruparam-se em um único ramo com suporte de 97% de bootstrap. O ramo onde

as amostras dos surtos de PE e CE se agruparam apresentou suporte de 78% de bootstrap. No surto do CE, a maioria das amostras 82,4% (n=103) foram relacionadas a variante MMeV.Tauton.GRB/27.12 (JX984461) e a sequências reportadas por outros 22 países. As amostras restantes (17,6%, n=22) não apresentaram 100% de identidade com quaisquer outras sequências previamente depositadas nos bancos de dados do NCBI e Means. No surto de PE, observou-se que um pouco mais da metade das amostras (54,2%, n=65) foram idênticas a MMeV.Tauton.GRB/27.12. Outras 53 amostras (44,9%) apresentaram uma substituição nucleotídica, que as diferenciavam desta variante. Tais amostras circularam em 11 cidades de PE por 36 semanas epidemiológicas (25.2013 a 8.2014). A primeira sequência (MMeV/Pernambuco.BRA/25.13/6) deste grupo foi considerada como uma variante na base de dados MeaNS.

Os casos esporádicos de D8 detectados em SC e ES se agruparam em clados diferentes (com suporte de 99% de bootstrap) das sequências dos surtos de PE e CE. Na busca de sequências correspondentes na base de dados MeaNS, as amostras de MMeV.Florianopolis\_SC.BRA/18.13 e MMeV.Vitoria\_ES.BRA/50.13 apresentaram, respectivamente, 100% de identidade com as variantes D8 MVi/Villupuram.Ind/03.07 (FJ765078) e MMeV/Frankfurt-Maine.DEU/17.11 (KF683445).

**Tabela 19: Substituições de nucleotídeos das sequências do gene N do vírus do sarampo das amostras brasileiras do genótipo D8 dos surtos de Pernambuco e Ceará e dos casos esporádicos, 2012-2015, em comparação com a cepa de referência da Organização Mundial da Saúde (MVi/Manchester.GBR/30.94) e cepas nomeadas definidas na base de dados da rede global do sarampo (MeaNS)**

Cepas	Substituições de nucleotídeos (numeração de acordo com os 450 nucleotídeos definidos pela OMS)																				
	89	90	129	130	143	180	186	188	200	206	212	225	227	228	230	236	239	250	251	252	
	G	G	A	G	T	A	G	A	C	A	C	A	G	C	G	T	T	A	A	C	
<b>M.Vi/Manchester.GBR/30.94_D8 (referência D8 OMS)</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	
<b>*JX984461_MVs/Taunton.GBR/27.12_D8</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	
M Vs/Pimavera_PE.BRA/19.13/8	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
M Vs/SantaCruzDoCapibaribe_PE.BRA/16.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
M Vs/Pombos_PE.BRA/20.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
M Vs/Moreno_PE.BRA/23.13/4	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
M Vs/Ipojuca_PE.BRA/25.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
M Vs/Goiana_PE.BRA/50.13/6	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
M Vs/Condado_PE.BRA/27.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
M Vs/Alianca_PE.BRA/28.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
M Vs/AbreuLima_PE.BRA/19.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
9Seq_M Vs/VitoriaDeSantoAntao_PE.BRA/16.13/5_a_24.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
7Seq_M Vs/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/12.13_23.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
5Seq_M Vs/Paulista_PE.BRA/16.13_21.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
5Seq_M Vs/Olinda_PE.BRA/12.13/2_a_26.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
2Seq_M Vs/JaboataoDosGuararapes_PE.BRA/18.13_19.13/10	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
2Seq_M Vs/Camaragibe_PE.BRA/18.13_19.13/9	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
12Seq_M Vs/Goiana_PE.BRA/19.13/4_a_45.13/4	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
13Seq_M Vs/Recife_PE.BRA/16.13/2_a_4.14/9	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
M Vs/Paracuru_CE.BRA/19.15/2	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
M Vs/Pacajus_CE.BRA/2.15/3	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
M Vs/Maracanau_CE.BRA/4.14/13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
M Vs/Itapoca_CE.BRA/5.14/9	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
M Vs/Groairas_CE.BRA/44.14	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
M Vs/Forquilha_CE.BRA/31.14	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
78Seq_M Vs/Fortaleza_CE.BRA/52.13_a_19.15	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
5Seq_M Vs/Massape_CE.BRA/28.14_a_36.14	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
4Seq_M Vs/Uruburetama_CE.BRA/5.14_a_14.14	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
3Seq_M Vs/Caucaia_CE.BRA/48.14_a_15.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
2Seq_M Vs/Trairi_CE.BRA/5.14/11_5.14/12	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
2Seq_M Vs/Martinopolis_CE.BRA/37.14/3_37.14/4	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
2Seq_M Vs/Itapipoca_CE.BRA/5.14/9_9.14	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
M Vs/SantanaDoAcarau_CE.BRA/30.14	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
7Seq_M Vs/Joao Pessoa_PB.BRA/21.13_a_24.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
M Vs/BoaVista_RR.BRA/1.15/2	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
M Vs/BeloHorizonte_MG.BRA/2.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
5Seq_M Vs/Sao Paulo_SP.BRA/5.14_a_7.14	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
2Seq_M Vs/Bauru_SP.BRA/52.12_2.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
**2Seq_M Vs/Fortaleza_CE.BRA/10.14_12.14	G	C	A	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
**M Vs/Sobral_CE.BRA/20.14	G	C	A	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
**M Vs/Fortaleza_CE.BRA/50.14	G	A	G	G	T	A	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
**M Vs/Maracanau_CE.BRA/53.14	G	G	A	G	T	A	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
**M Vs/Fortaleza_CE.BRA/51.14/3	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	C	G	
**M Vs/Fortaleza_CE.BRA/5.14/8	G	A	G	G	T	T	A	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
**2Seq_M Vs/RiodeJaneiro_RJ.BRA/37.14_37.14/2	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
**2Seq_M Vs/SenadorSa_CE.BRA/46.14_48.14	G	A	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
**2Seq_M Vs/Sobral_CE.BRA/22.14_24.14	G	A	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
**6Seq_M Vs/Forquilha_CE.BRA/31.14/2_a_36.14	G	A	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
**M Vs/Caucaia_CE.BRA/8.15/2	A	G	A	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
**M Vs/Fortaleza_CE.BRA/8.15	A	G	A	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	
**3Seq_M Vs/Fortaleza_CE.BRA/15.14_a_21.14	G	A	C	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	C	G	T	T	G	
**M Vs/Escada_PE.BRA/39.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	C	G	T	T	G	
<b>*M Vs/Pernambuco.BRA/25.13/6_D8</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	
22Seq_M Vs/Recife_PE.BRA/30.13_a_8.14	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	A	T	G	
2Seq_M Vs/Caruaru_PE.BRA/38.13/2_7.14/3	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	A	T	G	
3Seq_M Vs/Escada_PE.BRA/32.13_a_36.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	A	T	G	
4Seq_M Vs/JaboataoDosGuararapes_PE.BRA/31.13_a_48.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	A	T	G	
8Seq_M Vs/Goiana_PE.BRA/45.13_a_01.14	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	A	T	G	
9Seq_M Vs/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/25.13/6_a_38.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	A	T	G	
M Vs/AbreuLima_PE.BRA/49.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	A	T	G	
M Vs/Igarassu_PE.BRA/52.13/2	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	A	T	G	
M Vs/Olinda_PE.BRA/6.14/3	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	A	T	G	
M Vs/Sirinhaem_PE.BRA/33.13	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	A	T	G	
M Vs/Surubim_PE.BRA/4.14/10	G	A	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	A	T	G	
<b>*FJ765078_M Vi/Villupuram.Ind/03.07_D8</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	
M Vs/Florianopolis_SC.BRA/18.13	G	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	G	T	T	G	
<b>*KF683445_M Vs/Frankfurt_M ain.DEU/17.11_D8</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>G</b>
M Vs/Vitoria_ES.BRA/50.13	G	G	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	C	G	G	G	T	G
<b>*JX486001_M Vi/Hulu-Langat.M YS/26.11_D8</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>G</b>
<b>*KF214761_M Vs/Swansea.GBR/4.13_D8</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	

\* Cepas nomeadas do genótipo D8 definidas pela base de dados da rede global de sarampo (MeaNS).

\*\* Amostras que não apresentam 100% de identidade com nenhuma outra sequência depositada no MeaNS.

**Tabela 20:** Substituições de aminoácidos das sequências do gene N do vírus do sarampo das amostras dos surtos e casos esporádicos detectados no Brasil, 2012-2015, em relação a cepa de referência D8 da Organização Mundial da Saúde (MVi/Manchester/30.94). No anexo 10.3 consta a relação das sequências consenso com as respectivas cepas idênticas.

Cepas	Numeração de aminoácidos Gene N													
	405	419	423	442	444	451	452	454	455	459	467	510	522	
<b>AF280803_Mvi/Manchester/30.94_D8</b>	<b>R</b>	<b>F</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>R</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	
Consenso MMeV/SaoPaulo.BRA (7)	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	D	
MMeV/BeloHorizonte_MG.BRA/2.13	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	D	
Consenso MMeV/Pernambuco.BRA (116)	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	D	
MMeV/Escada_PE.BRA/39.13	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	P	.	D	
Consenso MMeV/Paraiba.BRA (7)	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	D	
MMeV/Florianopolis_SC.BRA/18.13	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	D	
Consenso MMeV/Ceara.BRA (10)	.	.	.	.	L	.	.	I	.	.	.	.	D	
Consenso MMeV/RioDeJaneiro.BRA (2)	.	.	.	.	L	.	.	I	.	.	.	.	D	
Consenso MMeV/Ceara.BRA (103)	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	D	
MMeV/Fortaleza_CE.BRA/5.14/8	.	.	.	.	.	.	.	I	E	.	.	.	D	
MMeV/Fortaleza_CE.BRA/51.14/3	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	P	D	
Consenso MMeV/Ceara.BRA (2)	K	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	D	
Consenso MMeV/Ceara.BRA (3)	.	L	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	D	
Consenso MMeV/Ceara.BRA (2)	.	.	.	.	.	.	.	I	.	P	P	.	D	
MMeV/Fortaleza_CE.BRA/50.14	.	.	.	.	.	.	K	I	.	.	.	.	D	
MMeV/Maracanao_CE.BRA/53.14	.	.	G	.	.	.	K	I	.	.	.	.	D	
MMeV/BoaVista_RR.BRA/1.15/2	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	D	
MMeV/Vitoria_ES.BRA/50.13	.	.	.	R	.	S	G	I	.	.	.	.	D	

Legenda: D, Aspartato; E, Glutamato; F, Fenilalanina; G, Glicina; I, Isoleucina; K, Lisina; L, Leucina; N, Asparagina; P, Prolina; Q, Glutamina; R, Arginina; S, Serina; T, Treonina;

## 5.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA REGIÃO RNC-MF DO VIRUS DO SARAMPO PARA SUBSIDIAR ESTUDOS DE EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Conforme anteriormente mencionado, o Instituto Nacional de Microbiologia/ Canadá desenvolveu um novo protocolo para sequenciamento do MEV, com base na região genômica RNC-MF, a qual apresenta maior variabilidade, quando comparada ao gene N (Gardy *et al.*, 2015). Dessa forma, pudemos investigar a variabilidade intra-genotípica ao longo do surto.

Nesse estudo, das 263 amostras identificadas do genótipo D8 no Brasil (2012-2015) pelo gene N, 80 amostras foram testadas no Canadá e 15 amostras foram testadas no LVRS para a RNC-MF, perfazendo um total de 95 amostras investigadas.

Não obtivemos amplificação e/ou a cobertura da sequência da RNC-MF (1018 nt) de 14/95 amostras testadas. Na figura 5-8 pode ser observado o padrão dos amplicons dos 6 fragmentos amplificados da RNC-MF. A dificuldade na obtenção da sequência dessa região já havia sido mencionada (Penedos *et al.*, 2015). Dessa forma, para a região RNC-MF, o conjunto de dados final compreendeu 81 sequências brasileiras do genótipo D8 (PE, n=32; CE, n=48 e SP, n=1; período 2012 a 2015) e 34 sequências representativas de outros países (Grã-Bretanha, n=30, Estados Unidos, n=2, Alemanha e Itália, n=1), depositadas no Genbank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (Tabela 14 ).

Para comparação das regiões do genoma analisado, gene N e região RNC-MF, foram reconstruídas duas árvores filogenéticas com as mesmas sequências (Figura 35 e 36) A análise da RNC-MF permitiu uma melhor definição na reconstrução filogenética das amostras do surto de D8 nos estados de Pernambuco e Ceará. Enquanto que a reconstrução filogenética do gene N formou apenas um clado que foram incluídas todas as sequências brasileiras dos surtos CE e PE e um caso esporádico de SP (2012-2015).

A topologia da árvore de MV da RNC-MF revelou que as amostras brasileiras se agruparam em dois principais clados, denominados: linhagem 1 (L1) e linhagem 2 (L2). Para a região RNC-MF, a definição das diferentes linhagens ainda não foi estabelecida pelo grupo de estudo de sequenciamento do vírus do sarampo da OMS (dados não publicados). A Tabela 21 apresenta as substituições de nucleotídeos na RNC-MF das amostras brasileiras sequenciadas neste estudo, em

comparação com MVi/Texas.USA/4.07. Todas as amostras agrupadas nas linhagens L1 e L2 apresentaram 16 substituições de nucleotídeos em comum: c4566t, t4575c, t4637c, g4727a, c4791t, c4887a, c4889t, t4905c, c4969t, t4970c, a5071g, g5111a, c5216t, t5218c, c5236t e c5436t.

A L1 apresentou suporte estatístico (valor de aLRT = 0,96) e apresentou oito substituições de nucleotídeos c4625t, c4760t (exceto na cepa MMeV/Recife\_PE.BRA/47.13), c5077t, c5157a, t5229c, g5311a, c5347t e a5382t, além das 16 substituições já citadas acima, quando comparada com a cepa MVi/Texas.USA/4.07. Em L1 agruparam-se a maior parte das amostras do surto que se iniciou no estado de PE e se dispersou por várias cidades de PE e CE (n =77/81, 95%). Neste clado, encontramos também uma outra amostra de D8 detectada no Brasil de um caso esporádico na cidade São Paulo que antecedeu 10 semanas epidemiológicas o surto de PE (caso SP, SE52.2012 - primeiro caso de PE, SE13.2013). Inclusas na L1, encontramos também amostras de D8 da Grã-Bretanha (SE 32.2012-30.13) e Canadá (SE 08.2013-17.2014).

Apesar de observarmos a formação de subgrupos em L1, não obtivemos suporte estatístico significativo em todos eles para considerá-los resolvidos da perspectiva filogenética. O mesmo foi notado em ramos com sequências brasileiras. Embora não possamos afastar a hipótese de que esses subgrupos se formaram ao acaso (dado os baixos valores de confiança dos ramos), é tentador especular sobre a distribuição das sequências brasileiras.

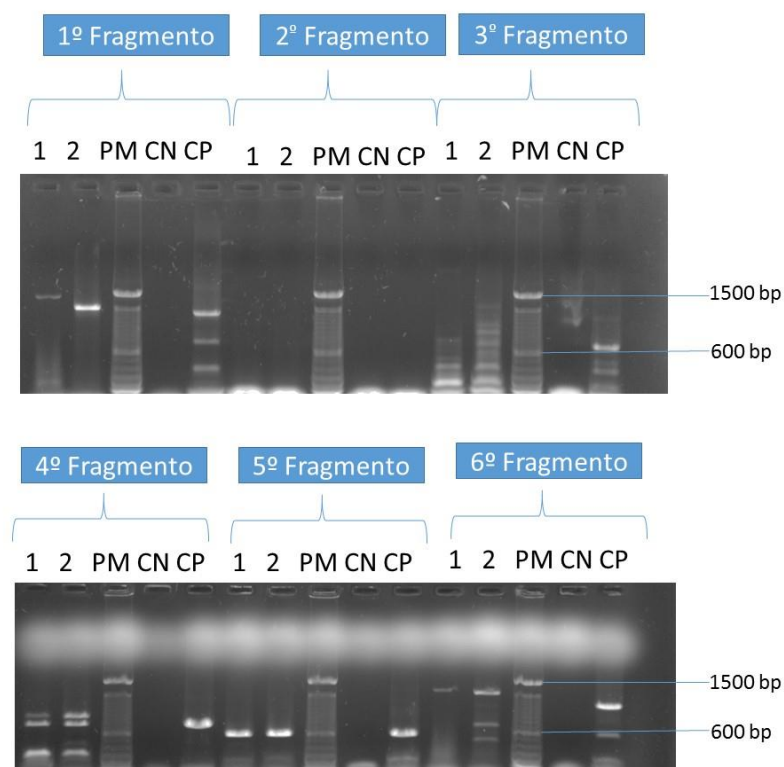
Os supostos subgrupos B e C foram compostos por sequências de Pernambuco. O primeiro com amostras coletadas de abril a julho de 2013 e, o segundo, majoritariamente composto por sequências de Goiana, obtidas em novembro e dezembro de 2013.

No primeiro subgrupo da árvore filogenética do clado L1, grupo denominado E, a maioria das sequências foram obtidas a partir de amostras coletadas no segundo semestre de 2014 e compreendem amostras dos demais municípios cearenses, além de Fortaleza. Parte das sequências de vírus circulantes em Fortaleza durante dezembro de 2014 formaram outro subgrupo (D), juntamente com uma sequência pernambucana de 1/12/2013 (MMeV/AbreuLima.PE-BRA/49.13).

No clado referido como linhagem L2 (valor de aLRT = 0,83) encontramos as substituições de nucleotídeos a4538g, c4851t, c5011t, c5292t, c5336t, c5393a, c5400a e g5469a. Sequências do Ceará agruparam-se com a sequência alemã MVi/Muenchen.DEU/19.13 e outras sequências representativas (Canadá e uma de 2012 da Grã-Bretanha).

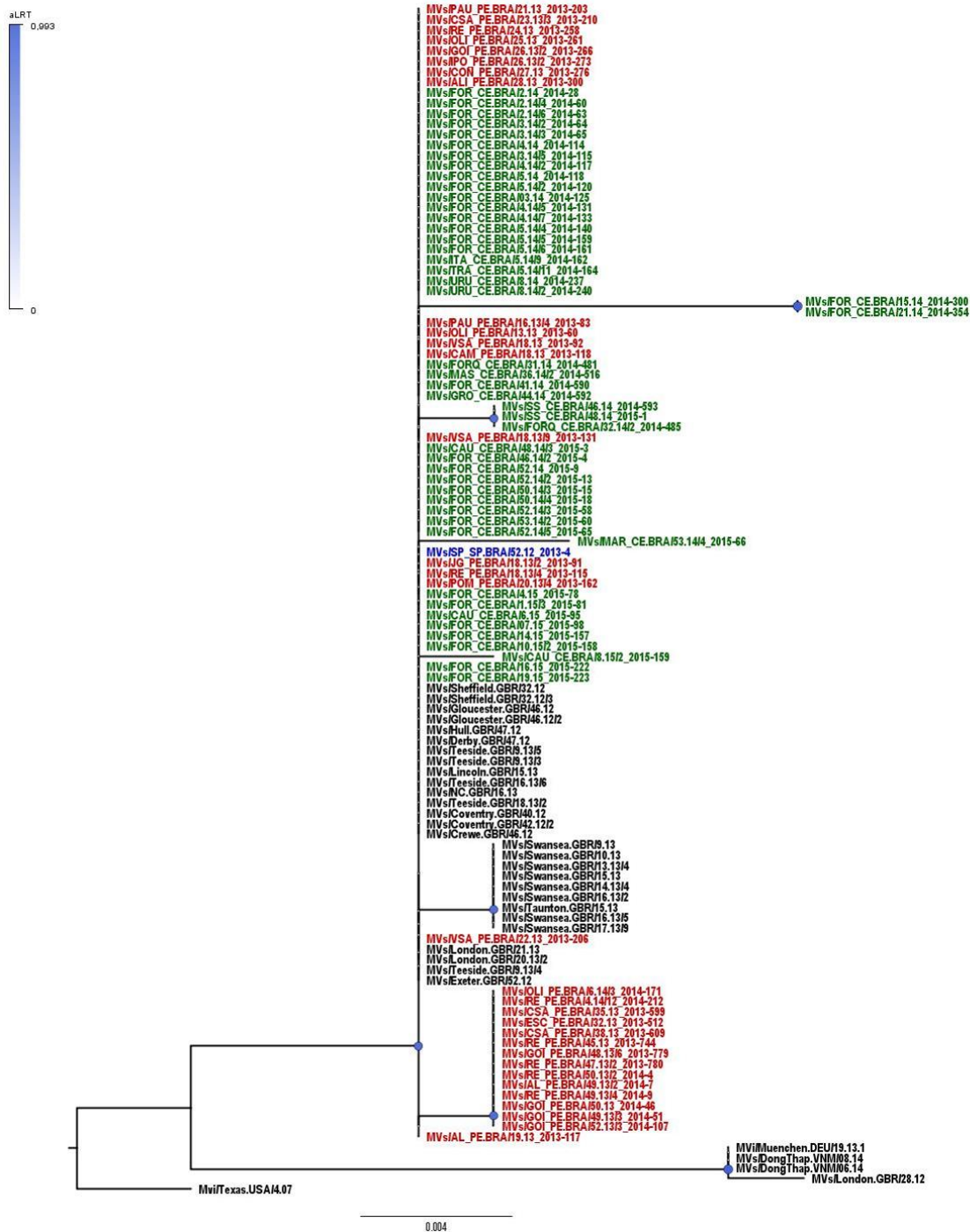
Em comparação com MMeV/Olinda\_PE.BRA/13.13, a primeira sequência obtida do surto de Pernambuco (16/04/2013), foram identificadas 17 substituições de nucleotídeos na região RNC-MF nas sequências do clado L2 (MMeV/Trairi\_CE.BRA/05.14, MMeV/Itapipoca\_CE.BRA/05.14, MMeV/Fortaleza\_C E.BRA/03.14 e MMeV/Fortaleza\_CE.BRA/06.15). Esse conjunto de achados sugere que L2 representa um segundo evento de introdução do MEV, no contexto do surto nordestino. Devido a equipe de coleta do estado (CE) não ter realizado 80% das coleta das amostras clínicas do surto, não podemos afirmar que a circulação e transmissão viral foi limitada a poucos casos.



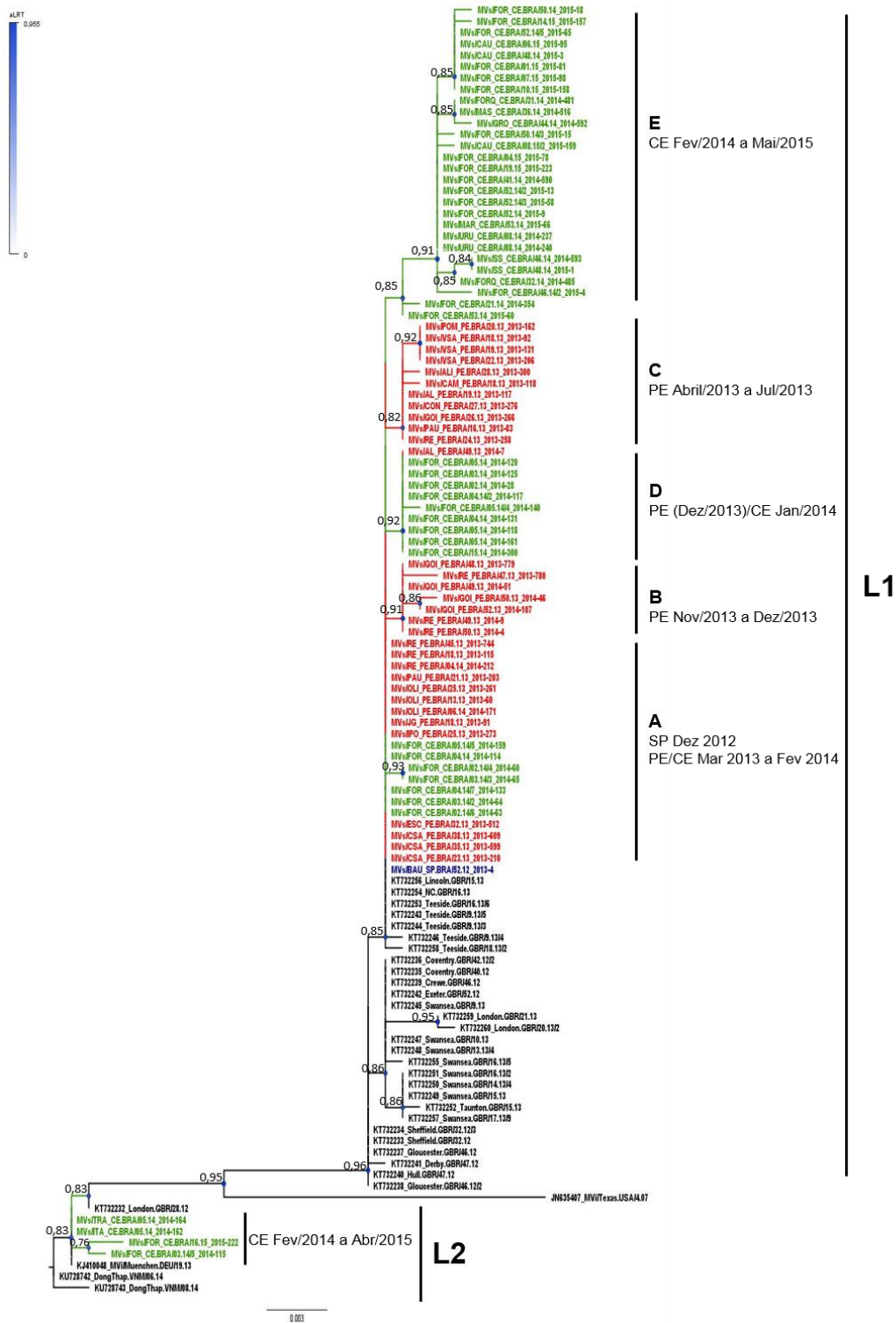


Sigla	Material	Resultado da amplificação dos fragmentos (tamanho esperada do amplicon - pb)					
		1 1409 pb	2 886 pb	3 736 pb	4 808 pb	5 626 pb	6 1200 pb
1	Amostra clínica 1	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos
2	Amostra clínica 2	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos
CN	Negative Control	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
CP	Positive Control	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos

**Figura 34:** Gel de agarose a 2%, após eletroforese mostrando o padrão de amplificação do produto da reação de RT-PCR dos 6 fragmentos do protocolo da região não codificante entre os genes *M* e *F* (RNC-MF). Legenda: PM – Peso molecular; CN – Controle negativo; CP – Controle positivo; pb – Pares de bases; Pos – positivo; Neg – negativo.



**Figura 35:** Reconstrução filogenética com 114 seqüências do gene N (503 nt) do vírus do sarampo circulante durante os surtos e caso esporádico (São Paulo - SP) ocorridos no Brasil (2013-2015), com seqüências representativas de outras regiões geográficas obtidas no GenBank. A reconstrução filogenética foi realizada por máxima verossimilhança, utilizando o Kimura 2 parâmetros (K2) como modelo de substituição nucleotídica. As seqüências brasileiras estão ilustradas na árvore filogenética com as cores: Ceará (CE) de verde; Pernambuco (PE) de vermelhas; caso esporádico de São Paulo (SP) de azul; As Seqüência do GenBank estão de preto. Próximo aos nós dos ramos estão os valores de aLRT acima de 0,8.



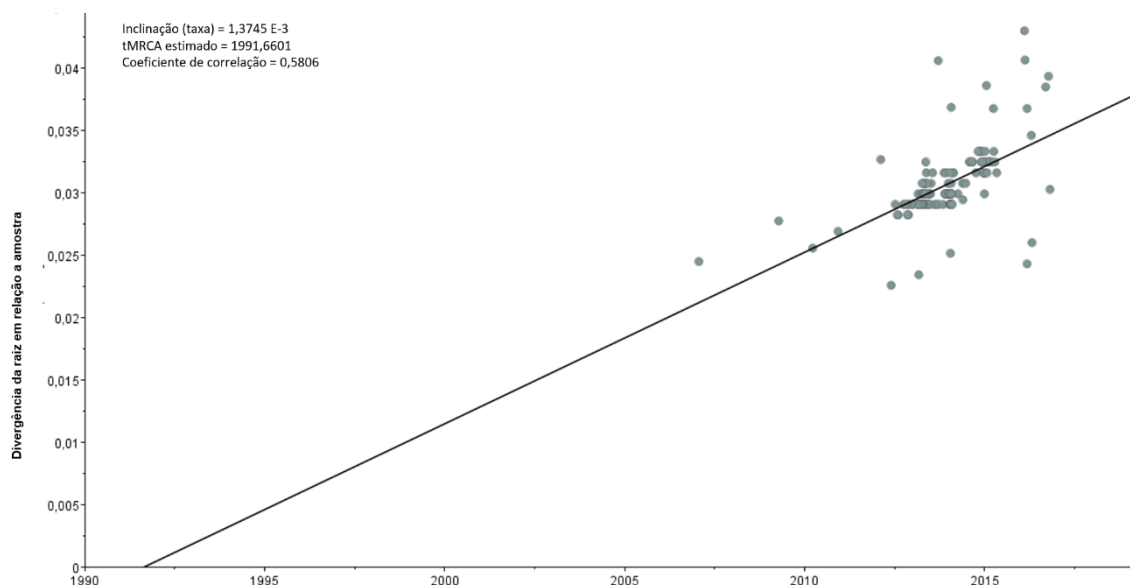
**Figura 36:** Reconstrução filogenética da região não codificante entre os genes *M* e *F* (1172nt) do vírus do sarampo, circulante durante os surtos nos estados de Pernambuco e Ceará, Brasil (2013-2015). A análise incluiu 114 sequências brasileiras e representativas de outras regiões geográficas. A reconstrução filogenética foi realizada por máxima verossimilhança, utilizando o Tamura-Nei + Gama como modelo de substituição de nucleotídeos. As sequências do Ceará (CE) encontram-se representadas em verde e as de Pernambuco (PE), em vermelho. Os valores de aLRT acima de 0,8 encontram-se indicados na árvore filogenética.





## 5.7 ANÁLISE BAYESIANA DA REGIÃO NÃO CODIFICANTE ENTRE OS GENE M E F DO VÍRUS DO SARAMPO

Inicialmente, procedemos à análise da estrutura temporal dos dados (Figura 37). Com base nos resultados obtidos, procedemos à análise evolutiva da região genômica RNC-MF do vírus do sarampo por método bayesiano, utilizando o modelo demográfico *Coalescent Bayesian Skyline*, com relógio molecular relaxado.



**Figura 37:** Análise de estrutura temporal da região RNC-MF do vírus do sarampo, em seqüências dos surtos de Pernambuco e Ceará (2013-2015).

Ao final da análise bayesiana, a taxa de evolução média foi estimada em  $1.976 \times 10^{-3}$  substituições/sítio/ano (95% HPD:  $1.458 \times 10^{-3}$  -  $2.534 \times 10^{-3}$ ).

A árvore de máxima credibilidade da região RNC-MF revelou uma melhor resolução dos subgrupos filogenéticos (definidos com base nos valores de probabilidade posterior  $> 0.9$ ), quando comparada a árvore filogenética obtida por MV da mesma região genômica (Figura 38). Ainda, o método permitiu a estimativa dos ancestrais comuns mais recentes (tMRCA) (Tabela 22).

Na linhagem 1 (L1), foram agrupadas sequências da Grã-Bretanha, (GBR) e do Canadá (CAN) e a maioria das sequências brasileiras analisadas (97.0%), com tMRCA foi estimado em abril de 2012 (semana epidemiológica (SE) 15.2012; 95% HPD: 39.2011-32.2012) (tabela 22).

A primeira sequência D8 do surto de PE (MMeV/Olinda.PE.BRA/13.13) foi identificada na SE 13.2013 e encontra-se incluída no grupo A, cujo tMRCA foi estimado na SE 49.2012 (95% HPD 39.2012-03.2013). Esse achado corrobora os dados epidemiológicos que indicam o início do surto em março de 2013 (Ministério da Saúde, 2013). Essa mesma linhagem foi identificada em cidades vizinhas de Pernambuco (Olinda, Jaboatão dos Guararapes, Recife, Paulista, Cabo de Santo Agostinho, Ipojuca e Escada) durante a SE 13.2013 a 06.2014, quase um ano após a primeira detecção. Ainda, com base nas sequências analisadas, essa mesma linhagem foi posteriormente identificada no CE, circulando entre a SE 03.2014 e 05.2014. É possível que essa cepa viral tenha circulado no início e final da epidemia. Entretanto, devido a falta de sequências representativas desses períodos não nos permite tal avaliação.

Além de A, outros grupos filogenéticos (p.p. superior a 0,9), foram identificados na L1: B, C, D e E (Figura 38). O tMRCA do grupo B (p.p = 0,97, substituição c5352t) foi estimado na SE 15.2013 (95% HPD 09.2013-19.2013), duas semanas após a primeira detecção em Olinda-PE (Tabela 22). Um subgrupo caracterizado pelas substituições c5352t e a4436g foi observado no grupo B, nas amostras de Pombos e Vitória de Santo Antão, duas semanas após o seu surgimento (SE 17.2013, 95% HPD 13.2013 a 21.2013).

O subgrupo C (substituição c5344t), emergiu em PE (tMRCA= SE 43.2013; 95% HPD 34.2013-49.2013) e circulou nas cidades de Goiana e Recife entre as SE 47.2013 e 52.2013.

O subgrupo D parece haver emergido em PE a partir da SE 45.2013 (média tMRCA=SE50.2013; 95% HPD 45.2013-52.2013), na cidade de Abreu Lima-PE. Em PE, observamos a circulação subgrupo entre a SE 49.2013 e a SE02.2014. Posteriormente, a mesma foi também detectada em Fortaleza-CE e circulou no estado do CE até a SE 05.2014.

O tMRCA médio do grupo E (substituição c5466t) - aparentemente o mais recente do surto de CE -, foi estimado na SE 09.2014 (95% HPD07.2014-10.2014).

Este subgrupo circulou em Fortaleza-CE. Um subgrupo definido pelas substituições g4587ae g4723 (p.p. = 0,98) foi observado, com casos nas cidades Uruburetama, Massape, Groiaras, Forquilha e Senador Sá.

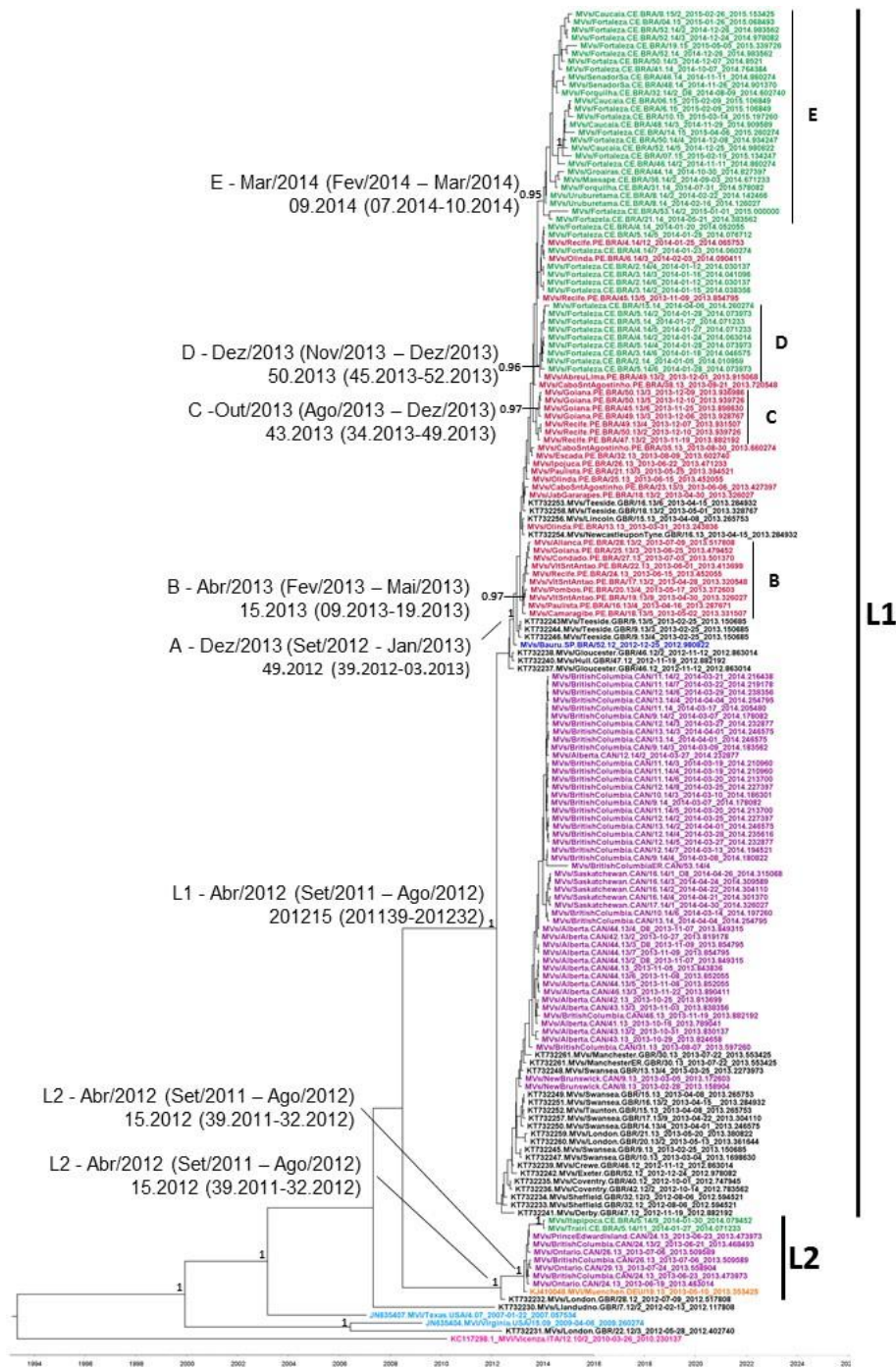
A segunda linhagem (L2) incluiu sequências da Alemanha, Grã-Bretanha, Canadá, bem como sequências do surto do CE (SE 18.2013; 95% de HPD: 08.2013-22.2013). O tMRCA desse clado a; fevereiro de 2014 (SE 06.2014; 95% HPD, 51.2013-08.2014).

**Tabela 22:** *Estimativa do ancestral comum mais recente (tMRCA) dos grupos genéticos das linhagens 1 e 2 (L1 e L2) das cepas brasileiras (BRA) e cepas internacionais referentes a análise bayesiana (figura 36) com o intervalo de 95% dos valores de densidade posterior em parênteses (95% HPD)*

Grupos genéticos	Mês/ano	média tMRCA (95% HPD)*
<b>*L1</b>	Abr/2012 (Set/2011-Ago/2012)	15.2012 (39.2011-32.2012)
A	Dez/2012 (Set/2012 - Jan/2013)	49.2012 (39.2012-03.2013)
B	Abr/2013 (Fev/2013-Mai/2013)	15.2013 (09.2013-19.2013)
C	Out/2013 (Ago/2013-Dez/2013)	43.2013 (34.2013-49.2013)
D	Dez/2013 (Nov/2013-Dez/2013)	50.2013 (45.2013-52.2013)
E	Mar/2014 (Fev/2013-Mai/2013)	09.2014 (07.2014-10.2014)
<b>L2</b>	Mai/2013 (Fev/2013-Mai/2013)	18.2013 (08.2013-22.2013)
L2 (BRA)	Fev/2014 (Dez/2013-Fev/2014)	06.2014 (51.2013-08.2014)

\*semana epidemiológica.ano





**Figura 38:** *Árvore de máxima credibilidade da região não codificante entre os genes M e F do vírus do sarampo, genótipo D8.* A análise incluiu seqüências brasileiras do suto nos estados de Pernambuco e Ceará (2013-2015) e seqüências representativas de outras regiões geográficas (2007-2015). A árvore temporal foi reconstruída por análise bayesiana, utilizando o modelo demográfico “*Coalescent Bayesian Skyline*”, relógio molecular relaxado (lognormal) e cadeia final de 20.000000 gerações (com amostragem a cada mil gerações) (pacote Beast v. v1.8.4). Os valores das probabilidades posteriores > 0.9 encontram-se indicados, bem como os tMRCA de cada grupo, representados em semanas epidemiológicas. As seqüências estão representadas na árvore com as cores: Ceará (CE), verde; Pernambuco (PE), vermelha; São Paulo (SP), azul; Grã-Bretanha - GBR, preto; Canadá - CAN, roxo; Itália - ITA, rosa; Alemanha - DEU, laranja; Estados Unidos da América - USA, azul claro.

## 6. DISCUSSÃO

O Sarampo é uma doença humana altamente contagiosa e imunoprevenível (Griffin, 2013). Desde a introdução da vacinação na década de 60 (Rota *et al.*, 2016a), foram observados progressos significativos no controle da doença e na redução da mortalidade em todo o mundo. Entretanto, a virose permanece endêmica em muitos países, que funcionam como fontes de exportação do vírus (Wolfson *et al.*, 2009; Furuse e Oshitani, 2017). Até o final de 2020, a OMS tem o objetivo de eliminar o sarampo no mundo. Nesse contexto, a comprovação da ausência de transmissão autóctone é um dos critérios para documentar a eliminação do MEV (Jost *et al.*, 2015).

A região das Américas interrompeu a circulação viral em 2000 e recebeu o certificado da eliminação do MEV em 2016. Porém, como observado em outros países (OPAS, 2015; OMS, 2015b), ocorreram casos esporádicos importados e dois surtos nos estados de Ceará e Pernambuco, no período de 2013 a 2015. Além do Brasil receber anualmente elevado número de estrangeiros, nesses anos que ocorreram os surtos, o país sediou alguns importantes eventos de massa como a Copa das Confederações (junho/2013), Jornada Mundial da Juventude (julho/2013) e a Copa do Mundo (junho e julho/2014), abrangendo 315 eventos internacionais, em 54 cidades do país. Nesses eventos, em torno de 126 mil turistas estrangeiros vieram para o Brasil, com tempo médio de permanência estimada em 3,8 dias (Governo do Brasil, 2016). Eventos esportivos e religiosos já foram identificados como fontes potenciais de transmissão do MEV. Os Jogos de Inverno 2010 em Vancouver e a Copa do Mundo em 2010 na África do Sul, foram associados com um grande número de casos de sarampo relatados pelo Canadá, Argentina e Brasil em 2010 (Castillo-Solorzano, C. *et al.*, 2011c). Outros países já relataram surtos de sarampo associados a reuniões de massa (CDC, 2008b; Pfaff *et al.*, 2010; Santibanez *et al.*, 2014). Portanto, uma das hipóteses levantadas no presente estudo foi com relação à origem dos surtos nos estados do CE e PE e sua (s) potencial (is) fonte (s) de introdução.

A caracterização genética do MEV combinada aos dados epidemiológicos é usada para a investigação de casos suspeitos. Países que possuem um sistema de vigilância epidemiológica e laboratorial robustos detectam, com

frequência, casos esporádicos ou surtos provenientes de importações. Com o objetivo de buscar um melhor entendimento sobre a circulação do MEV, investigamos a diversidade genética e a distribuição de linhagens virais do genótipo D8 ocorrido nos estados do PE e CE no período 2013-2015, para identificar as possíveis fontes de introdução, bem como a disseminação viral.

No Brasil, a vacina contra o sarampo é gratuitamente oferecida pelo Ministério da Saúde. A primeira dose da vacina (tríplice viral) é administrada aos 12 meses e, a segunda, aos 15 meses de idade. Entretanto, na ocorrência de surtos, o Ministério da Saúde recomenda a vacinação a partir de 6 meses de idade (Ministério da Saúde, 2017). Ainda, o Programa Nacional de Imunizações e a OMS estabelecem a meta de 95% da cobertura vacinal de forma homogênea em todas as localidades do país, para que não haja a formação de bolsões de indivíduos susceptíveis, favorecendo a introdução e transmissão de vírus importado (OMS, 1999). Portanto, mesmo na presença de alta taxa de cobertura vacinal, a análise de homogeneidade é fundamental, sobretudo no cenário de eliminação da doença (Coughlin *et al.*, 2017). No nosso estudo, a maioria dos casos com detecção de anticorpos IgM anti-sarampo, ocorreu em pessoas não imunizadas e abaixo de um ano de idade. No estado de PE, a cobertura vacinal nessa faixa etária encontrou-se acima de 95% (Ministério da Saúde, 2013). Entretanto, no CE, além da falta de homogeneidade, as coberturas vacinais encontraram-se abaixo do recomendado em 27 dos 184 municípios levantados (14,7%) (Leite *et al.*, 2015). Ainda, 7,5% dos indivíduos de 15 a 70 anos foram soronegativos para anticorpos IgG, taxa acima do nível de suscetibilidade tolerável estabelecida pela OMS (cerca de 5% em indivíduos acima de 15 anos de idade) (Mulders *et al.*, 2016).

Na vigilância do MEV, além do monitoramento do perfil de imunidade de indivíduos susceptíveis da população, é necessário o monitoramento da transmissão do vírus nos casos de sarampo (OMS, 2000). A maior parte do diagnóstico dos casos ainda é realizado por técnicas sorológicas pelos laboratórios nacionais de sarampo. O período da coleta de cada material clínico é de crucial importância para a correta classificação dos casos de sarampo quer seja para os testes sorológicos ou virológicos. Foi descrito que o período ideal da coleta do material clínico para a detecção de IgM deve ser realizada entre o

4º e 11º dia do início da infecção (Helfand *et al.*, 1999), ao passo que para a detecção viral, a coleta da secreção nasofaríngea e/ou urina deve ser realizada o quanto antes, após o início do exantema (OMS, 1999).

No presente estudo, observamos uma boa correspondência entre a detecção sorológica (IgM) e a detecção do RNA viral por PCR em tempo real, visto que, mais de 90% das amostras foram positivas em ambas as metodologias. Entretanto, em um pequeno número de casos, ocorreu a confirmação da doença por detecção de IgM no soro e não houve a detecção do RNA viral no material clínicos de secreção nasofaríngea e urina. No entanto, não foi possível mensurar se o material foi coletado no período que ocorreu a excreção viral, uma vez que não foram informadas nas fichas epidemiológicas dos casos a data do início do exantema.

Durante a fase de eliminação do sarampo é importante que diferentes metodologias sejam empregadas para detecção acurada dos casos. Dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos são essenciais para o fechamento do diagnóstico, como a situação vacinal do indivíduo, faixa etária e históricos de viagens (Bellini e Helfand, 2003; Rota *et al.*, 2009; Halsey e Salmon, 2015; Durrheim, 2018). A detecção viral é a técnica mais sensível para a detecção dos casos (Mosquera *et al.*, 2005). Pela metodologia de PCR em tempo Real verificamos que 8,5% (n=22) das amostras foram positivas na detecção viral dos casos identificados como negativos por técnica sorológica assim como, Santibanez e colaboradores (2002) encontraram porcentagem de discordância semelhante entre as técnicas quando testaram 623 casos suspeitos de sarampo e descreveram que 87% dos casos testados mostraram correspondência entre sorologia e detecção do RNA viral e 9% não tiveram a detecção de IgM. Não conseguimos identificar se os casos discordantes não foram detectados como positivos na sorologia por coleta de material clínico em período inapropriado ou se eram indivíduos vacinados na infância. Casos de sarampo subclínico têm sido relatados em crianças com anticorpos maternos residuais, adultos com história de sarampo natural na fase da infância e indivíduos vacinados com diminuição nos títulos dos anticorpos (Chen *et al.*, 1989). É necessária investigação epidemiológica e laboratorial de casos suspeitos de sarampo, independente do estado da vacinação. Visto que a transmissão do vírus pode ocorrer em

indivíduos que foram vacinados com duas doses de vacina contra o sarampo e indivíduos que foram acometidos pela doença na infância e na fase adulta foram reinfectados (Rosen *et al.*, 2014). O teste de avidéz poderia responder melhor as questões referentes à detecção das imunoglobulinas específicas aos casos com histórico de vacina, uma vez que as amostras de indivíduos recentemente infectados teriam pouca avidéz de anticorpos IgG, enquanto que aqueles de pessoas infectadas ou imunizadas no passado teriam alta avidéz de anticorpos IgG (Hübschen *et al.*, 2017).

Nos indivíduos vacinados, em caso de reinfecção pelo MEV os títulos de IgM podem ser indetectáveis nos ensaios de sorologia por estarem baixos ou ausentes (Santibanez *et al.*, 2014). Considerando que parte dos casos suspeitos foram fechados por ausência de detecção de IgM por técnicas sorológicas pelos LACENs, possivelmente poderiam ter sido positivos por técnicas mais sensíveis como a PCR em tempo real. Num estudo realizado na Bielorrússia em 2005, Atrasheuskaya e colaboradores demonstraram que em uma população com alta cobertura vacinal, casos de sarampo podem ter o diagnóstico clínico e sorológico alterado, visto que a maioria dos casos positivos apresentavam IgM não reagente. A investigação de casos e a coleta da amostragem, ocorrem geralmente após o início do exantema, isto implica que o número de casos de sarampo comunicados pode ser subestimado baseando-se apenas na sorologia para IgM. Assim, para confirmar o diagnóstico e para definir as características epidemiológicas do sarampo, é necessária a combinação de investigações sorológicas e virológicas (Featherstone *et al.*, 2011).

Esforços para atingir os objetivos de eliminação do MEV incluem altas coberturas vacinais e melhoras da vigilância baseadas em dados epidemiológicos e laboratoriais. Um dos componentes essenciais da vigilância é a epidemiologia molecular por permitir analisar e traçar a cadeia de transmissão do MEV, através da análise molecular destes vírus com a identificação de genótipos de um fragmento do genoma viral (gene N, 450 nucleotídeos). Esta análise fornece um método importante para verificar a efetividade dos programas de vacinação, com o objetivo de definir cepas autóctones e importadas. A epidemiologia molecular também é utilizada para diferenciar os vírus selvagens e dos vírus vacinais quando a detecção viral ocorre em casos de vacina recente.

As técnicas sorológicas não diferem se os anticorpos contra o sarampo foram gerados pela vacina ou pela infecção natural pelo MEV (Rota *et al.*, 2009; Rota *et al.*, 2011; OMS, 2012).

Para a eliminação e manutenção do controle do sarampo, estudos que abordam a caracterização molecular dos casos de sarampo identificado, pesquisando a sua origem e evolução genética são fundamentais. A identificação dos genótipos e a distribuição global destes têm permitido o rastreamento da sua circulação geográfica através dos anos (OMS e OPAS, 2017; Ceccarelli *et al.*, 2018; Cosgun *et al.*, 2018).

Desde 1992, 8 genótipos do MEV (A, B3, C2, D4, D5, D6, D8 e G3) foram relatados no Brasil (Oliveira *et al.*, 2001; Siqueira *et al.*, 2001; Castro-Silva, 2002; Oliveira *et al.*, 2003; Prevots *et al.*, 2003; Venczel *et al.*, 2003; Rota *et al.*, 2011). Através das análises filogenéticas das nossas amostras que ocorreram no período de 2013 a 2015, foram possíveis identificar os genótipos que circularam nesse período e as possíveis fontes de importação desses vírus. O genótipo identificado nos surtos, investigados nesse estudo, foi o D8. Outros genótipos identificados foi o A e o D4, B3 e o D8 em casos esporádicos com diferentes eventos de importações.

O genótipo A foi identificado no surto de PE e em 4 estados brasileiros (Distrito Federal, Paraná, Paraíba e São Paulo). Em todos os casos a data de coleta do material clínico foi próximo a data da vacinação. Atualmente, os vírus de tipo selvagem do genótipo A já não circulam e não há evidência de transmissão dos vírus vacinal de pessoa a pessoa (OMS, 2015a). Casos vacinais foram identificados em outros estudos em indivíduos recém vacinados (Rota *et al.*, 1995; Morfin *et al.*, 2002; Kaic *et al.*, 2010; Kaida *et al.*, 2018). Como no surto que ocorreu na Califórnia em 2015, onde um grande número de casos suspeitos de sarampo foi notificado de indivíduos que haviam sido recentemente vacinados (Zipprich *et al.*, 2015). Para que não seja necessário o sequenciamento e análise do vírus nos casos vacinais, foi desenvolvido o protocolo de PCR em tempo real para a detecção do genótipo A dos casos vacinais (Thomas *et al.*, 2017). Em fase de eliminação do MEV quanto mais rápida for a identificação viral, melhor será para a tomada de providências e medidas de saúde pública para a contenção de surtos.

Os casos esporádicos envolvendo o genótipo B3, foram de brasileiros com histórico de viagem para áreas endêmicas, como Etiópia e países europeus. A cepa viral foi identificada como uma variante MVi/Harare.ZWE que apresentava ampla circulação no período do nosso estudo. Em 2013, esta cepa foi identificada em mais de 30 países como, Canadá, Estados Unidos, Paquistão e Sudão (Rota, J. S. *et al.*, 2011), este último faz fronteira com a Etiópia. O genótipo B3 já havia sido identificado no Brasil em 2010, causando 65 casos nos estados da Paraíba e no Rio Grande do Sul (Ministério da Saúde, 2010). Atualmente apresenta ampla circulação mundial, sendo identificado nas seis regiões da OMS em 2018 (Mulders, 2018).

O genótipo D4 teve diversas introduções no Brasil, com cerca de 6 eventos em diferentes anos. A primeira introdução foi em 2003, resultando em dois casos em Santa Catarina, seguido por um surto envolvendo de 57 casos na Bahia, em 2006. Em 2010 e 2012, esse genótipo também causou surtos esporádicos no Pará e PE, respectivamente. Em 2011, foram observados casos esporádicos nos estados do Distrito Federal, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e um surto com 12 casos em São Paulo (Oliveira *et al.*, 2012). O genótipo D4 circula globalmente, ocasionando tanto surtos, como casos esporádicos. A circulação de variantes do mesmo genótipo tem sido relatada na Europa e em outros países, como o Paquistão e Japão (Kaida *et al.*, 2018; Zahoor Zaidi *et al.*, 2018).

No Brasil, o D8 foi o genótipo que circulou por mais tempo desde a interrupção da circulação do MEV (em 2000). Esse genótipo foi detectado pela primeira vez na última semana epidemiológica (SE) de 2012 (Oliveira *et al.*, 2012) em um caso importado, onde o indivíduo infectado retornou de viagem da Flórida, Estados Unidos da América. Após o retorno ao Brasil, ocorreram dois casos secundários já no ano 2013 (um contactante de São Paulo e um de Minas Gerais). O genótipo D8 também foi identificado 10 semanas após a estes casos, em PE no mês de março (SE 12.2013), nas cidades de Olinda e Santo Agostinho. O caso índice não foi identificado e não houve relato de viagem para o exterior desses pacientes. Entretanto, o paciente de Santo Agostinho viajou para Recife dias antes de manifestar os sintomas da doença e a paciente de Olinda relatou que recebeu em seu domicílio parentes moradores de Luxemburgo. Não

podemos afirmar que a transmissão ocorreu através destes indivíduos. Após a detecção destes casos nas cidades de Olinda e Santo Agostinho, o vírus foi identificado em outras cidades de PE e na Paraíba, com a identificação de 7 casos associados ao genótipo D8 (SE 21.2013 a 24.2013). As sequências identificadas na Paraíba não diferiam em nenhum nucleotídeo das cepas de PE. No final de 2013, o mesmo genótipo foi identificado em CE, e após casos de sarampo identificados no Rio de Janeiro e Roraima foram relacionados a viagens dos indivíduos ao CE.

O surto que estudamos neste trabalho foi ocasionado por transmissão autóctone do D8 nos estados de PE e CE, ao longo do período 2013-2015 (Leite *et al.*, 2015), de modo que foi considerado endêmico nesses estados, segundo o critério da OMS que define a endemicidade da doença com a circulação com 12 meses ou mais do mesmo genótipo do MEV (Icenogle *et al.*, 2011; OMS, 2012). Entretanto, a reconstrução filogenética do gene N corrobora os dados epidemiológicos, sugerindo diferentes introduções do genótipo D8 no Brasil. As sequências dos casos esporádicos de Santa Catarina e Espírito Santo (ambos com relato de viagem para Europa) foram agrupadas em clados diferentes da maioria das sequências brasileiras (PE e CE) e apresentaram similaridade com as variantes MVi/Villupuram.IND/03.07 e MMeV/Frankfurt Main.DEU/17.11 (OMS, 2015a) .

O genótipo D8 foi relatado pela primeira vez no Reino unido em 1994 (Jin *et al.*, 1997). Diversas variantes genéticas deste genótipo tem sido identificadas mundialmente, causando múltiplos surtos, sendo relacionado a casos de importações e casos endêmicos (Truong *et al.*, 2001; Amendola *et al.*, 2017; Seppälä *et al.*, 2017; Cosgun *et al.*, 2018). Até junho de 2018, no banco de dados MeaNS consta a circulação de pelo menos 16 variantes (chamadas também de cepas nomeadas) desse genótipo no mundo (OMS, 2015a). Surtos com o genótipo D8 e diferentes variantes foram relatados em países endêmicos no mesmo período do nosso estudo. Kalaycioglu e colaboradores (2016) descreveram que no surto na Turquia foram identificados os mesmos genótipos encontrados no Brasil (D8, D4, B3 e A), também com a maior predominância do genótipo D8. Entretanto, a maioria das cepas foram idênticas à cepa nomeada MMeV/FrankfurtMain.DEU/17.11, associada a diferentes surtos na Europa.



Amendola e colaboradores (2017) descreveram o perfil genético dos MEV circulantes das diferentes cadeias de transmissão do surto de Lombardia (Itália), onde a maioria das sequências italianas (86,3%) agruparam-se com a variante MMeV / Taunton.GBR / 27.12, 11,4% com a variante MMeV/Frankfurt-Main.DEU/17.11 e 2,3% com a variante MVi/HuluLangat.MYS/ 26.11.

Na análise da região C-terminal do gene N foi demonstrado que dentre as 16 variantes (cepas nomeadas) identificadas no MeaNS, três destas foram relacionadas com as amostras brasileiras (2013-2015) e uma cepa brasileira tornou-se nomeada (MMeV/Pernambuco.BRA/25.13/6). A maioria das cepas identificadas eram idênticas à variante MMeV/Taunton.GRB/27.12 e a outras cepas da Grã-Bretanha. A variante brasileira MMeV/Pernambuco.BRA/25.13/6 foi relacionada a quase metade das cepas obtidas do surto de PE, com circulação de 9 meses em onze diferentes municípios de PE, sendo reportada poucas semanas depois (SE 11.2014) pela Holanda no MeaNS (MMeV/ZuidHollandZuid.NLD/11.14, KJ690781) (OMS, 2015a). Não sabemos dizer se essa cepa circulava antes da semana 25.2013 em outros países, foi introduzida no Brasil e só após foi identificada e reportada pela Holanda em 2014. Assim como não é possível afirmar que as cepas identificadas no surto de CE que não tiveram sequências correspondentes reportadas por outras regiões do mundo, evoluíram e circularam apenas no Brasil ou se houve circulação em outras regiões e não foram reportadas por nenhum outro grupo de pesquisa.

Ao analisarmos as sequências de aminoácidos da região C-terminal do gene N das sequências do genótipo D8 brasileiras, foi possível identificar algumas substituições que demonstram variabilidade desta região como descrito anteriormente (Rota *et al.*, 1994). Duas substituições em resíduos de aminoácidos identificadas nas sequências do gene N, T454I e N522D, mantiveram-se conservadas entre as amostras do surto. O resíduo de aminoácido N522 está relacionado com a interação com a hsp72 (proteína do choque térmico) que promove a síntese de RNA e a propagação do vírus do sarampo (Carsillo *et al.*, 2006). Ainda não foi esclarecido quais as implicações que as alterações observadas nestas regiões podem representar para as funções biológicas da proteína. Observamos que a divergência de nucleotídeos

entre as amostras dos surtos foi de até 0,85%. Esta baixa taxa sugere uma diversidade genética limitada entre os MEV circulantes (Rima *et al.*, 1995). Resultados semelhantes foram descritos em trabalhos com outros genótipos do MEV. Um dos trabalhos descreveu que a divergência de nucleotídeos foi de 0,7% quando analisaram sequências da região C-terminal do gene N do genótipo H1 de casos de uma epidemia de 2000-2001 na Coreia (Na *et al.*, 2003). Percentual mais baixo foi descrito por Naseri e colaboradores em 2011, ao analisar sequência dessa mesma região do genótipo D4. O grupo descreveu que quando comparadas entre si, as sequências apresentaram um percentual de divergência de nucleotídeos de 0,5% (Naseri *et al.*, 2011). Assim, a determinação da origem viral usando apenas uma parte do genoma torna-se difícil, principalmente, em regiões onde um genótipo em específico tem sido detectado por um longo tempo.

A análise do fragmento da região C-terminal do gene N das sequências dos surtos de PE e CE não permitiram avaliar a ocorrência de diferentes importações do MEV, possivelmente em decorrência das limitações dessa região genômica (OMS, 2012). Cenário semelhante foi descrito por Thomas e colaboradores (2017) em um surto ocorrido com 17 casos na província de Ontário (Canadá) em 2015. As cepas do genótipo D4 identificadas apresentavam sequências do gene H e região C-terminal do gene N idênticas ou minimamente variáveis. O grupo apoiou a hipótese de uma única importação com o sequenciamento da Região não codificante entre os genes M e F (NCR-MF). Essa região era idêntica nos casos do surto, com exceção de um caso que diferiu de um único nucleotídeo, e apresentava um padrão característico de inserção e deleção (Thomas *et al.*, 2017). Os desafios recentes em surtos de sarampo em países que estão em fase de eliminação da doença, como o Brasil e o Canadá no período do estudo, levou a novas pesquisas em outras regiões do genoma ou no genoma completo do MEV (Sparrer *et al.*, 2014; Rota *et al.*, 2016a; Dina *et al.*, 2017).

Os esforços desenvolvidos pela OMS para a eliminação do sarampo levaram à diminuição da incidência da doença, com conseqüente redução da diversidade genética dos vírus circulantes em várias regiões (Rota, J. S. *et al.*, 2011). Os casos pertencentes à mesma cadeia de transmissão geralmente apresentam sequências idênticas do gene N, o que pode dificultar a identificação

de importações, com base nessa região do genoma (OMS, 2015a). Neste contexto, abordagens adicionais são recomendadas para melhor explorar a epidemiologia molecular do vírus. O sequenciamento de fragmentos maiores do genoma do MEV oferece potencial para uma maior resolução das vias de transmissão, incluindo a diferenciação entre múltiplas fontes de importação de linhagens do mesmo genótipo que co-circulam, comprovando ou não a endemicidade da doença na região geográfica (OMS, 2018c). Outra abordagem consiste em sequenciar outras regiões do genoma viral, com maior variabilidade do que o gene N, como a região não codificante entre os genes M e F (RNC-MF) (Gardy *et al.*, 2015). A RNC-MF foi identificada como a parte mais variável do genoma do MEV (Bankamp *et al.*, 2014). Por essa razão, permite a melhor diferenciação de variantes do MEV, sobretudo quando considerado o mesmo genótipo. Portanto, o sequenciamento da RNC-MF pode contribuir para uma melhor vigilância global (Harvala *et al.*, 2016) e a sua utilização para a análise de surtos fornece vantagens para responder a questões epidemiológicas específicas, no contexto da baixa diversidade dos genótipos circulantes. Penedos e colaboradores (2015) verificaram o padrão de circulação viral do genótipo D8 identificados no Reino Unido analisando a RNC-MF (Penedos *et al.*, 2015). O grupo concluiu que os casos foram de transmissão continuada ao invés de múltiplas importações.

Um grupo de pesquisadores batizado de N.E.W (do inglês, “Next generation, Extended window and WHOle genome sequencing working group”) da rede global de laboratórios da OMS foi formado para a padronização da análise da extensão do sequenciamento, além da região C-terminal e do gene H do genoma do MEV. Este grupo de trabalho está se reunindo para padronizar metodologias e interpretação dos achados genômicos, visando melhor subsidiar a vigilância virológica do MEV. Como o estudo encontra-se em andamento, os critérios para definição de linhagens virais com base na região RNC-MF ainda não foram estabelecidos – como já realizado para o fragmento do gene N e H, regiões padronizadas para a genotipagem viral até o momento (OMS, 2018c). Conforme comunicações orais de instituições parceiras, alguns pesquisadores propõem que quatro substituições de nucleotídeos entre cepas possam indicar a classificação de diferentes linhagens virais (Dr Alberto Severini/ Instituto

Nacional de Microbiologia/ Ministério da Saúde/ Canadá, 14/05/2018). Para o Dr. Kevin Brown (Saúde Pública da Inglaterra/ Departamento de saúde/ Reino Unido, 27/06/2018), entretanto, a diferenciação entre linhagens com base nessa região genômica deveria contemplar mais do que quatro substituições nucleotídicas. Os resultados acumulados, incluindo os do presente estudo, contribuirão para melhor esclarecer e definir esses critérios. No período do estudo em cooperação com o Instituto Nacional de Microbiologia do Canadá realizamos a análise da região RNC-MF para a identificação de linhagens virais dentro do genótipo D8. Poucos países realizavam a análise desse fragmento do genoma e atualmente é recomendado pela OMS (OMS, 2018c). O protocolo da análise desse fragmento do genoma do MEV foi repassado e implementado no LVRS para estudo dos surtos de sarampo.

Ao comparar as reconstruções filogenéticas das duas regiões do genoma analisada pode ser notado a maior variabilidade genética na região RNC-MF. Esta permitiu uma melhor resolução dos grupos genéticos no surto do D8 no Brasil, considerando que na análise da região C-terminal do gene N formou-se um único clado com as amostras do surto de CE, PE e os casos esporádicos que ocorreram no período de 2013 a 2015. A maioria das sequências brasileiras (97%) foi associada as sequências que circulavam na Grã-Bretanha em ambas regiões do genoma analisada. No entanto, com a análise da região RNC-MF, o clado L2 com cepas brasileiras mostrou-se mais intimamente relacionado com a cepa de Frankfurt a partir de 2013 e eles estão mais próximos das cepas que circularam no Vietnã, em 2014 e na Croácia, em 2015. Entretanto, é importante ressaltar que no período do estudo, muitos países estavam com surto de sarampo e poucos países analisaram a RNC-MF. As sequências disponíveis da RNC-MF são limitadas por isso não reflete a distribuição global das cepas do MEV, nem mesmo as sequências dessa região das variantes identificadas na base de dados da rede global de sarampo (MeaNS) foram realizadas.

Nas árvores filogenéticas da região RNC-MF, reconstruídas por máxima verossimilhança e análise bayesiana, observamos a presença de duas linhagens do genótipo D8 no surto ocorrido no nordeste brasileiro (2013-2015). A primeira sequência foi de Olinda (PE, SE 13. 2013) e as nossas análises estão de acordo com os dados epidemiológicos, que indicam que o início do surto ocorreu em

março de 2013, uma semana após as festividades do carnaval que atraíram milhares de turistas para o estado de PE. Essa cepa circulou entre as cidades vizinhas de Pernambuco (Olinda, Jaboatão dos Guararapes, Recife, Paulista, Cabo de Santo Agostinho, Ipojuca e Escada) durante a SE 13.2013 a 06.2014, quase um ano após a primeira detecção. Sugerimos que no surto de PE ocorreu uma única introdução do MEV, possivelmente importada da Grã-Bretanha (figura 36). Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de outras introduções em PE, uma vez que trabalhamos com uma amostragem do referido surto, visando a caracterização molecular dos vírus circulantes. A primeira sequência cearense da linhagem L1, obtida em 2014 (SE 02.14), foi agrupada com sequências de Abreu Lima (PE) na SE 49.13, o que poderia sugerir a expansão do surto de PE para o CE. No surto cearense, observamos maior variabilidade genética viral, com a identificação de 3 clados na linhagem L1, circulantes entre as SE 02.2014 a 19.2015.

Além de L1, observamos a formação de um segundo clado, composto pela sequência alemã MVi/Muenchen.DEU/19.13 e sequências cearenses de Trairi, Ipojuca e Fortaleza (janeiro de 2014), a qual denominamos L2. Esses achados sugerem duas diferentes introduções do vírus ao longo do surto cearense. A primeira, possivelmente, oriunda da Gra-Bretanha (L1) e a segunda da Alemanha (L2), cuja circulação pareceu ser limitada a um pequeno número de casos. Entretanto, é importante destacar a pequena proporção de amostras recebidas do surto cearense, inclusive com coleta concentrada no pico epidêmico, de modo que é possível que tenha ocorrido a circulação de um maior número de casos associados a L2 ou mesmo outras introduções que não puderam ser identificadas em virtude dessa limitação.

Num estudo realizado na Suécia em surtos do MEV ocorridos de 2013 a 2014, Harvala e colaboradores verificaram o papel do sequenciamento dos genes N, H e da região não codificante entre os genes M e F (RNC-MF) em surto causados por dois genótipos (B3 e D8). Dos 10 surtos causados pelo genótipo D8, cinco foram caracterizados apenas pelo gene N. A análise da região C-terminal do gene N dos outros 5 surtos demonstraram que as sequências de D8 e de B3 eram idênticas, logo insuficientes para responder em relações a diferentes introduções. O sequenciamento da RNC-MF e do gene H foram

fundamentais para proporcionar uma melhor resolução dos casos (Harvala *et al.*, 2016), corroborando os nossos achados.

A presente investigação trouxe contribuições importantes para fortalecimento da vigilância epidemiológica de sarampo no país, especialmente para a investigação de surtos. Inicialmente, os achados demonstraram o valor das ferramentas de diagnóstico molecular para a identificação de casos, em especial da reação de RT-PCR em tempo real. Considerando o cenário epidemiológico de eliminação do vírus e a alta cobertura vacinal na maioria dos estados brasileiros, parte dos casos agudos não apresentarão anticorpos IgM. Nesse contexto, é fortemente recomendável que os casos suspeitos – segundo a classificação da OMS e Ministério da Saúde - e IgM negativos sejam submetidos à subsequente detecção molecular, para a efetiva confirmação laboratorial ou descarte do mesmo. Ainda, o estudo comparativo entre diferentes regiões genômicas do vírus indicou que o uso da região RNC-MF, de maior variabilidade genética quando comparada ao gene N (tradicionalmente utilizado para estudos de epidemiologia molecular), não apenas permite a genotipagem viral, mas apresenta melhor resolução da perspectiva filogenética e, conseqüentemente, maior adequação à investigação de surtos. Finalmente, os nossos achados agregarão informações importantes ao estudo em curso, coordenado pela OMS, com relação à determinação de genótipos e linhagens virais, com base nessa região genômica. Tais informações são vitais para subsidiar estudos de epidemiologia molecular pela Rede Global de Sarampo e pelo Ministério da Saúde, com ênfase na transmissão do viral.

## 7. CONCLUSÃO

- Este estudo reforça a presença de casos importados de sarampo no Brasil, compatível com o cenário de eliminação do MEV nas Américas.
- A exclusiva detecção de anticorpos IgM para a confirmação dos casos positivos de sarampo não constitui uma estratégia diagnóstica confiável no atual cenário epidemiológico, considerando a divergência encontrada entre os resultados os resultados sorológicos e a detecção molecular do MEV.
- O surto ocorrido nos estados de Pernambuco e Ceará no período 2013-2015 foi ocasionado pelo genótipo D8 variante Taunton do MEV. E uma cepa brasileira (Pernambuco/25.13) foi reconhecida como uma variante pela rede global do sarampo.
- Na análise das duas regiões do genoma do MEV, a maioria das sequências identificadas dos surtos foram relacionadas às sequências da Grã-Bretanha.
- O sequenciamento do gene N constitui uma abordagem adequada para a determinação do genótipo viral. Contudo, análises complementares, utilizando genes ou regiões genômicas com maior variabilidade são imprescindíveis para a da investigação de surtos, identificação e rastreamento de cadeias de transmissão.
- A análise filogenética com base na região RNC-MF permitiu evidenciar que, ao menos duas linhagens virais distintas foram introduzidas durante o surto no nordeste brasileiro.
- A vigilância virológica, mediante a análise de sequências genômicas virais, constitui uma abordagem complementar de relevantíssimo valor para a investigação e caracterização de surtos, em apoio às abordagens epidemiológicas clássicas, visando a adoção oportuna das medidas de controle e prevenção de novos casos.

## **8. PERSPECTIVA**

- Continuar analisando a RNC-MF no laboratório de referência brasileiro, nas investigações de outros surtos ou casos esporádicos no Brasil.



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amendola A, Bianchi S, Lai A, Canuti M, Piralla A, Baggieri M. Measles re-emergence in Northern Italy: Pathways of measles virus genotype D8, 2013-2014. *Infect Genet Evol.* 2017 Mar;48:120-6.

Artimos de Oliveira S, Jin L, Siqueira MM, Cohen BJ. Atypical measles in a patient twice vaccinated against measles: transmission from an unvaccinated household contact. *Vaccine.* 2000 Dec;19(9-10):1093-6.

Artimos de Oliveira S, Bastos Camacho LA, Uzeda Barreto MC, Coca Velarde LG, Siqueira MM. Serologic status of women in an urban population in Brazil before and after rubella immunization campaign using routine screening data. *J Infect Dis.* 2011 Sep 1;204 Suppl 2:S664-8.

Aversa G, Carballido J, Punnonen J, Chang CC, Hauser T, Cocks BG, et al. SLAM and its role in T cell activation and Th cell responses. *Immunol Cell Biol.* 1997 Apr;75(2):202-5.

Auwaerter PG, Rota PA, Elkins WR, Adams RJ, DeLozier T, Shi Y. Measles virus infection in rhesus macaques: altered immune responses and comparison of the virulence of six different virus strains. *J Infect Dis.* 1999 Oct;180(4):950-8.

Babbott FL, Jr., Gordon JE. Modern measles. *Am J Med Sci.* 1954 Sep;228(3):334-61.

Bankamp B, Bellini WJ, Rota PA. Comparison of L proteins of vaccine and wild-type measles viruses. *J Gen Virol.* 1999 Jul;80 ( Pt 7):1617-25.

Bankamp B, Kearney SP, Liu X, Bellini WJ, Rota PA. Activity of polymerase proteins of vaccine and wild-type measles virus strains in a minigenome replication assay. *J Virol.* 2002 Jul;76(14):7073-81.

Bankamp B, Byrd-Leotis LA, Lopareva EN, Woo GK, Liu C, Jee Y. Improving molecular tools for global surveillance of measles virus. *J Clin Virol.* 2013 Sep;58(1):176-82.

Bankamp B, Liu C, Rivaller P, Bera J, Shrivastava S, Kirkness EF, et al. Wild-type measles viruses with non-standard genome lengths. *PLoS One.* 2014;9(4):e95470.

Baxby D. The diagnosis of the invasion of measles from a study of the exanthema as it appears on the buccal mucous membrane By Henry Koplik, M.D. Reproduced from *Arch. Paed.* 1997. 13, 918-922 (1886). *Rev Med Virol*, v. 7, n. 2, p. 71-74,.

Bellini WJ, Englund G, Rozenblatt S, Arnheiter H, Richardson CD. Measles virus P gene codes for two proteins. *J Virol.* 1985 Mar;53(3):908-19.

Bellini WJ, Helfand RF. The challenges and strategies for laboratory diagnosis of measles in an international setting. *J Infect Dis.* 2003 May 15;187 Suppl 1:S283-90.

Bennett J, Whittle H, Samb B, Cisse B, Simondon F, Aaby P. Seroconversions in unvaccinated infants: further evidence for subclinical measles from vaccine trials in Niakhar, Senegal. *Int J Epidemiol.* 1999 Feb;28(1):147-51.

Bourhis JM, Canard B, Longhi S. Structural disorder within the replicative complex of measles virus: functional implications. *Virology.* 2006 Jan;344(1):94-110.

Bowen AC, Ferson MJ, Palasanthiran P. Consequences of an unrecognized measles exposure in an emergency department. *Emerg Med Australas.* 2009 Dec;21(6):491-6.

Brasil P, Calvet GA, Siqueira AM, Wakimoto M, de Sequeira PC, Nobre A, et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Apr;10(4):e0004636.

Buchanan R, Bonthius DJ. Measles virus and associated central nervous system sequelae. *Semin Pediatr Neurol.* 2012 Sep;19(3):107-14.

Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Second ed. Rio de Janeiro; 2013.

Cáceres VM, Strebel PM, Sutter RW. Factors determining prevalence of maternal antibody to measles virus throughout infancy: a review. *Clin Infect Dis.* 2000 Jul;31(1):110-9.

Carsillo T, Zhang X, Vasconcelos D, Niewiesk S, Oglesbee M. A single codon in the nucleocapsid protein C terminus contributes to in vitro and in vivo fitness of Edmonston measles virus. *J Virol.* 2006 Mar;80(6):2904-12.

Castillo-Solorzano C, Marsigli C, Danovaro-Holliday MC, Ruiz-Matus C, Tambini G, Andrus JK. Measles and rubella elimination initiatives in the Americas: lessons learned and best practices. *J Infect Dis.* 2011a Jul;204 Suppl 1:S279-83.

Castillo-Solórzano C, Reef SE, Morice A, Andrus JK, Ruiz Matus C, Tambini G, et al. Guidelines for the documentation and verification of measles, rubella, and congenital rubella syndrome elimination in the region of the Americas. *J Infect Dis.* 2011b Sep;204 Suppl 2:S683-9.

Castillo-Solorzano CC, Matus CR, Flannery B, Marsigli C, Tambini G, Andrus JK. The Americas: paving the road toward global measles eradication. *J Infect Dis.* 2011c Jul;204 Suppl 1:S270-8.

Castro-Silva R. Sarampo no Brasil: Caracterização genotípica e imunidade da população do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2002.

CDC. Recommendations from an ad hoc Meeting of the WHO Measles and Rubella Laboratory Network (LabNet) on use of alternative diagnostic samples for measles and rubella surveillance. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2008a Jun;57(24):657-60.

\_\_\_\_\_. Multistate measles outbreak associated with an international youth sporting event--Pennsylvania, Michigan, and Texas, August-September 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2008b Feb;57(7):169-73.

\_\_\_\_\_. Global measles mortality, 2000-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009 Dec;58(47):1321-6.

\_\_\_\_\_. Increased transmission and outbreaks of measles, European Region, 2011; 2011 2 DECEMBER 2011, p.557-564.

Ceccarelli G, Vita S, Riva E, Cella E, Lopalco M, Antonelli F, et al. Susceptibility to measles in migrant population: implication for policy makers. *J Travel Med.* 2018 Jan;25(1).

Chen RT, Goldbaum GM, Wassilak SG, Markowitz LE, Orenstein WA. An explosive point-source measles outbreak in a highly vaccinated population. Modes of transmission and risk factors for disease. *Am J Epidemiol.* 1989 Jan;129(1):173-82.

Cosgun Y, Guldemir D, Coskun A, Yolbakan S, Kalaycioglu AT, Korukluoglu G, et al. The importance of serological and molecular analyses for the diagnosis of measles cases and for meeting elimination targets in Turkey from 2007 to 2015. *Epidemiol Infect.* 2018 Mar:1-6.

Coughlin MM, Beck AS, Bankamp B, Rota PA. Perspective on Global Measles Epidemiology and Control and the Role of Novel Vaccination Strategies. *Viruses.* 2017 01;9(1).

Coura JR (Editor). *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias.* Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2013. 2ª ed.

Cox R, Plemper RK. The paramyxovirus polymerase complex as a target for next-generation anti-paramyxovirus therapeutics. *Front Microbiol.* 2015;6:459.

Cutts FT, Markowitz LE. Successes and failures in measles control. *J Infect Dis.* 1994 Nov;170 Suppl 1:S32-41.

De Quadros CA, Olive JM, Hersh BS, Strassburg MA, Henderson DA, Brandling-Bennett D. Measles elimination in the Americas. Evolving strategies. *JAMA.* 1996 Jan 17;275(3):224-9.

Dias LR, Berezin N. Measles in Latin America: Current Situation. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2015 Sep;4(3):179-81.

Dina J, Hamel J, Antona D, Vabret A. Complete Genome Sequence of a Wild-Type Measles Virus Isolated during a 2016 Winter Outbreak in a Refugee Settlement in Calais, France. *Genome Announc.* 2017 Mar;5(10).

Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol.* 2007 Nov;7:214.

Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.* 2012 Aug;29(8):1969-73.

Durrheim DN. Measles Elimination, Immunity, Serosurveys and other Immunity Gap Diagnostic Tools. *J Infect Dis.* 2018 Mar.

Enders JF, Katz SL, Milovanovic MV, Holloway A. Studies on an attenuated measles-virus vaccine. I. Development and preparations of the vaccine: technics for assay of effects of vaccination. *N Engl J Med.* 1960 Jul 28;263:153-9.

Featherstone DA, Rota PA, Icenogle J, Mulders MN, Jee Y, Ahmed H, et al. Expansion of the global measles and rubella laboratory network 2005-09. *J Infect Dis.* 2011 Jul;204 Suppl 1:S491-8.

Fiebelkorn AP, Redd SB, Gallagher K, Rota PA, Rota J, Bellini W, et al. Measles in the United States during the postelimination era. *J Infect Dis.* 2010 Nov;202(10):1520-8.

Filia A, Bella A, Cadeddu G, Milia MR, Del Manso M, Rota MC, et al. Extensive Nosocomial Transmission of Measles Originating in Cruise Ship Passenger, Sardinia, Italy, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015 Aug;21(8):1444-6.

Flores-García ML, Colín-Castro CA, Hernández-Palestina MS, Sánchez-Larios R, Franco-Cendejas R. Absence of Measles Virus Detection from Stapes of Patients with Otosclerosis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2018 Jan;158(1):158-62.

Fulginiti VA, Eller JJ, Downie AW, Kempe CH. Altered reactivity to measles virus. Atypical measles in children previously immunized with inactivated measles virus vaccines. *JAMA.* 1967 Dec;202(12):1075-80.

Furuse Y, Oshitani H. Global Transmission Dynamics of Measles in the Measles Elimination Era. *Viruses.* 2017 Apr;9(4).

Galindo MA, Santin M, Resik S, Ribas MA, Guzman M, Mas Lago P, et al. Eradication of measles in Cuba. *Rev Panam Salud Publica.* 1998 Sep;4(3):171-7.

Gardy JL, Naus M, Amlani A, Chung W, Kim H, Tan M, et al. Whole-Genome Sequencing of Measles Virus Genotypes H1 and D8 During Outbreaks of Infection Following the 2010 Olympic Winter Games Reveals Viral Transmission Routes. *J Infect Dis.* 2015 Nov;212(10):1574-8.

Gay NJ. The theory of measles elimination: implications for the design of elimination strategies. *J Infect Dis.* 2004 May;189 Suppl 1:S27-35.

Ge YL, Zhai XW, Zhu YF, Wang XS, Xia AM, Li YF. Measles Outbreak in Pediatric Hematology and Oncology Patients in Shanghai, 2015. *Chin Med J (Engl).* 2017 Jun;130(11):1320-6.

Gidding HF, Quinn HE, Hueston L, Dwyer DE, McIntyre PB. Declining measles antibodies in the era of elimination: Australia's experience. *Vaccine.* 2018 Jan;36(4):507-13.

Goodson JL, Seward JF. Measles 50 Years After Use of Measles Vaccine. *Infect Dis Clin North Am.* 2015 Dec;29(4):725-43.

Governo do Brasil. Eventos internacionais no Brasil aumentam 408% em dez anos. 2017. Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/noticias/turismo/2016/08/eventos-internacionais-no-brasil-crescem-em-400>>. Acessado em setembro de 2016.

Grayeli AB, Palmer P, Tran Ba Huy P, Soudant J, Sterkers O, Lebon P, et al. No evidence of measles virus in stapes samples from patients with otosclerosis. *J Clin Microbiol.* 2000 Jul;38(7):2655-60.

Greenwood KP, Hafiz R, Ware RS, Lambert SB. A systematic review of human-to-human transmission of measles vaccine virus. *Vaccine.* 2016 May;34(23):2531-6.

Griffin DE, Ward BJ, Esolen L M. Pathogenesis of measles virus infection: an hypothesis for altered immune responses. *J Infect Dis.* 1994. v. 170 Suppl 1, p. S24-31.

Griffin DE. Immune responses during measles virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1995;191:117-34.

\_\_\_\_\_. Measles virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology.* 6th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2013. p. 1042-69.

Guindon S, Gascuel O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology.* 2003 October 1, 2003;52(5):696-704.

Halsey NA, Salmon DA. Measles at Disneyland, a problem for all ages. *Ann Intern Med.* 2015 May;162(9):655-6.

Harrison MS, Sakaguchi T, Schmitt AP. Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Sep;42(9):1416-29.

Harvala H, Wiman Å, Wallensten A, Zakikhany K, Englund H, Brytting M. Role of Sequencing the Measles Virus Hemagglutinin Gene and Hypervariable Region in

the Measles Outbreak Investigations in Sweden During 2013-2014. *J Infect Dis.* 2016 Feb;213(4):592-9.

Heider A, Santibanez S, Tischer A, Gerike E, Tikhonova N, Ignatyev G, et al. Comparative investigation of the long non-coding M-F genome region of wild-type and vaccine measles viruses. *Arch Virol.* 1997;142(12):2521-8.

Helfand RF, Kim DK, Gary HE, Edwards GL, Bisson GP, Papania MJ, et al. Nonclassic measles infections in an immune population exposed to measles during a college bus trip. *J Med Virol.* 1998 Dec;56(4):337-41.

Helfand RF, Kebede S, Mercader S, Gary HE, Beyene H, Bellini WJ. The effect of timing of sample collection on the detection of measles-specific IgM in serum and oral fluid samples after primary measles vaccination. *Epidemiol Infect.* 1999 Dec;123(3):451-5.

Hersh BS, Tambini G, Nogueira AC, Carrasco P, De Quadros CA. Review of regional measles surveillance data in the Americas, 1996-99. *Lancet.* 2000 Jun 3;355(9219):1943-8.

Hinman AR. World eradication of measles. *Rev Infect Dis.* 1982 Sep-Oct;4(5):933-9.

Hirano A, Ayata M, Wang AH, Wong TC. Functional analysis of matrix proteins expressed from cloned genes of measles virus variants that cause subacute sclerosing panencephalitis reveals a common defect in nucleocapsid binding. *J Virol.* 1993 Apr;67(4):1848-53.

Hu A, Norrby E. Role of individual cysteine residues in the processing and antigenicity of the measles virus haemagglutinin protein. *J Gen Virol.* 1994 Sep;75 ( Pt 9):2173-81.

Hummel KB, Lowe L, Bellini WJ, Rota PA. Development of quantitative gene-specific real-time RT-PCR assays for the detection of measles virus in clinical specimens. *J Virol Methods.* 2006 Mar;132(1-2):166-73.

Hübschen JM, Bork SM, Brown KE, Mankertz A, Santibanez S, Ben Mamou M, et al. Challenges of measles and rubella laboratory diagnostic in the era of elimination. *Clin Microbiol Infect.* 2017 Aug;23(8):511-5.

Icenogle JP, Siqueira MM, Abernathy ES, Lemos XR, Fasce RA, Torres G, et al. Virologic surveillance for wild-type rubella viruses in the Americas. *J Infect Dis.* 2011 Sep 1;204 Suppl 2:S647-51.

ICTV. ICTV Taxonomy history: Measles morbillivirus. 2017, Citado em 03/05/2017; Disponível em: [https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode\\_id=20161044](https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20161044).

Jardetzky TS, Lamb RA. Activation of paramyxovirus membrane fusion and virus entry. *Curr Opin Virol.* 2014 Apr;5:24-33.

Jin L, Brown DW, Ramsay ME, Rota PA, Bellini WJ. The diversity of measles virus in the United Kingdom, 1992-1995. *J Gen Virol*. 1997 Jun;78 ( Pt 6):1287-94.

Jin J. JAMA patient page. Measles vaccination. *JAMA*. 2015 Apr;313(13):1386.

Jost M, Luzi D, Metzler S, Miran B, Mutsch M. Measles associated with international travel in the region of the Americas, Australia and Europe, 2001-2013: a systematic review. *Travel Med Infect Dis*. 2015 2015 Jan-Feb;13(1):10-8.

Kaic B, Gjenero-Margan I, Aleraj B, Vilbic-Cavlek T, Santak M, Cvitković A. Spotlight on measles 2010: excretion of vaccine strain measles virus in urine and pharyngeal secretions of a child with vaccine associated febrile rash illness, Croatia, March 2010. *Euro Surveill*. 2010 Sep;15(35).

Kaida A, Iritani N, Kanbayashi D, Yamamoto SP, Hirai Y, Hakui N, et al. Ten-Year Surveillance of Measles Virus from 2007-2016 in Osaka City, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2018 Mar;71(2):152-4.

Karlin D, Longhi S, Canard B. Substitution of two residues in the measles virus nucleoprotein results in an impaired self-association. *Virology*. 2002 Oct;302(2):420-32.

Kato A, Kiyotani K, Sakai Y, Yoshida T, Nagai Y. The paramyxovirus, Sendai virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis. *EMBO J*. 1997 Feb;16(3):578-87.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980 Dec;16(2):111-20.

Klinge M, Hartter HK, Adu F, Ammerlaan W, Ikusika W, Muller CP. Resistance of recent measles virus wild-type isolates to antibody-mediated neutralization by vaccinees with antibody. *J Med Virol*. 2000 Sep;62(1):91-8.

Komune N, Ohashi M, Matsumoto N, Kimitsuki T, Komune S, Yanagi Y. No evidence for an association between persistent measles virus infection and otosclerosis among patients with otosclerosis in Japan. *J Clin Microbiol*. 2012 Mar;50(3):626-32.

Kouznetsov A, Buckle M, Tordo N. Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the viral RNA. *J Gen Virol*. 1998 May;79 ( Pt 5):1005-13.

Krugman S, Giles JP, Jacobs AM, Friedman H. Studies with live attenuated measles-virus vaccine. Comparative clinical, antigenic, and prophylactic effects after inoculation with and without gamma-globulin. *Am J Dis Child*. 1962 Mar;103:353-63.

\_\_\_\_\_. Studies with a further attenuated live measles-virus vaccine. *Pediatrics*. 1963 Jun;31:919-28.

Leite RD, Barreto JL, Sousa AQ. Measles Reemergence in Ceara, Northeast Brazil, 15 Years after Elimination. *Emerg Infect Dis*. 2015 Sep;21(9):1681-3.

Lemos DR, Franco AR, de Sá Roriz ML, Carneiro AK, de Oliveira Garcia MH, de Souza FL. Measles epidemic in Brazil in the post-elimination period: Coordinated response and containment strategies. *Vaccine*. 2017 03;35(13):1721-8.

Lund GA, Tyrrell DL, Bradley RD, Scraba DG. The molecular length of measles virus RNA and the structural organization of measles nucleocapsids. *J Gen Virol*. 1984 Sep;65 ( Pt 9):1535-42.

LVRS. Sorologia ensaio com kit Siemens/Dade Behring para detecção de anticorpos IgM sarampo. Ferreira, D. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2007.

LVRS. POP-LVRS-001 Sorologia ensaio com kit Siemens para detecção de IgM sarampo. Ferreira, D ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2007a.

\_\_\_\_\_. POP-LVRS-TC001 Eletroforese em gel de agarose. Motta, F ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2007b.

\_\_\_\_\_. POP-LVRS-TE-002 Sorologia ensaio com kit Siemens para detecção de anticorpos IgG sarampo. Ferreira, D ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2008.

\_\_\_\_\_. POP-LVRS-TC-001 Extração de RNA kir Qiamp viral mini kit. Motta, F ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2010a.

\_\_\_\_\_. POP-LVRS-TE011 Transcrição reversa aplicada ao vírus da rubéola e do sarampo utilizando a enzima MMLV. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2010b.

\_\_\_\_\_. POP-LVRS-TE018 PCR Reação em cadeia da polimerase aplicada aos genes N e H do vírus do sarampo. Lemos, X ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2010c.

\_\_\_\_\_. POP-LVRS-TC-004 Purificação de produto de PCR extraído do gel de agarose com o kit "QIAquick Gel Extraction". Motta, F ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2010d.

\_\_\_\_\_. POP-LVRS-TC-007 Preparação das amostras para sequenciamento automático de nucleotídeos - Kit Big Dye Terminator Cycle sequencing standard " versão 3.1". Motta, F ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2010e.

\_\_\_\_\_. POP-LVRS-TE-027 Reação de PCR em tempo real (TaqMan) para detecção do vírus do sarampo. Silva, SS ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2011a.

\_\_\_\_\_. POP-LVRS-TE029 Reação de RT-PCR para a genotipagem do vírus do sarampo (CDC) 634 pb. Silva, SS ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2011b.



\_\_\_\_\_. POP-LVRS-TC-018 Purificação do produto da reação de sequenciamento isopropanol 75% em placa de 96 poços. Silva, P ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2012.

M&RI. Measles & Rubella Initiative. 2017. Citado em: 20/02/2017; Disponível em: <http://measlesrubellainitiative.org/>.

McKenna MJ, Mills BG. Immunohistochemical evidence of measles virus antigens in active otosclerosis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1989 Oct;101(4):415-21.

Melenotte C, Cassir N, Tessonier L, Brouqui P. Atypical measles syndrome in adults: still around. *BMJ Case Rep.* 2015 Sep;2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Investigação de surto de sarampo no Rio Grande do Sul, agosto de 2010. 43 2010.

\_\_\_\_\_. Boletim epidemiológico Surto de sarampo em Pernambuco. 2013

\_\_\_\_\_. Portaria No-2014, SMEV/MS nº 204 de 17 de fevereiro de 2016 2016.

\_\_\_\_\_. Guia de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Brasília, Brasil. 1: 250 p. 2017.

\_\_\_\_\_. NOTA INFORMATIVA Nº 135-SEI/2017-CGPNI/DEVIT/SMEV/MS. 2018

\_\_\_\_\_. Portal da Saúde: Situação epidemiológica/dados., 2017. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-sarampo> >. Acesso em: 05/04/2017.

\_\_\_\_\_. Guia de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Brasília, Brasil: 812 p. 2014. Ministério da Saúde. Portaria No-2014, SVS/MS nº 204 de 17 de fevereiro de 2016. 2016.

Morfin F, Beguin A, Lina B, Thouvenot D. Detection of measles vaccine in the throat of a vaccinated child. *Vaccine.* 2002 Feb;20(11-12):1541-3.

Morley D. Severe measles in the tropics. I. *Br Med J.* 1969 Feb;1(5639):297-300 contd.

Mosquera MM, De Ory F, Gallardo V, Cuenca L, Morales M, Sánchez-Yedra W. Evaluation of diagnostic markers for measles virus infection in the context of an outbreak in Spain. *J Clin Microbiol.* 2005 Oct;43(10):5117-21.

Moss WJ, Strebel P. Biological feasibility of measles eradication. *J Infect Dis.* 2011 Jul;204 Suppl 1:S47-53.

Moss WJ. Measles. *Lancet.* 2017 Dec;390(10111):2490-502.

Mulders MN, Rota PA, Icenogle JP, Brown KE, Takeda M, Rey GJ, et al. Global Measles and Rubella Laboratory Network Support for Elimination Goals, 2010-2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016 May;65(17):438-42.

Mulders M. Encontro de atualização dos laboratórios de referência regional (arquivo pessoal). 2018, Abril. Argentina.

Muscat M. Who gets measles in Europe? *The Journal of Infectious Diseases.* 2011 Oct 15 2011;204(suppl\_1):S353–S65.

Myers TM, Pieters A, Moyer SA. A highly conserved region of the Sendai virus nucleocapsid protein contributes to the NP-NP binding domain. *Virology.* 1997 Mar 17;229(2):322-35.

Myers TM, Smallwood S, Moyer SA. Identification of nucleocapsid protein residues required for Sendai virus nucleocapsid formation and genome replication. *J Gen Virol.* 1999 Jun;80 ( Pt 6):1383-91.

Na BK, Shin JM, Lee JY, Shin GC, Kim YY, Lee JS, et al. Genetic and antigenic characterization of measles viruses that circulated in Korea during the 2000-2001 epidemic. *J Med Virol.* 2003 Aug;70(4):649-54.

Naniche D, Yeh A, Eto D, Manchester M, Friedman RM, Oldstone MB. Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of Alpha/Beta interferon production. *J Virol.* 2000 Aug;74(16):7478-84.

Naseri M, Salimi V, Mokhtari-Azad T, Esteghamati A, Gooya M, Nadji S, et al. Molecular Epidemiology of Measles Virus before and after the 2003 Mass Vaccination Campaign for Measles/Rubella in Iran. *Iran J Public Health.* 2011;40(1):41-9.

Navaratnarajah CK, Oezguen N, Rupp L, Kay L, Leonard VH, Braun W, et al. The heads of the measles virus attachment protein move to transmit the fusion-triggering signal. *Nat Struct Mol Biol.* 2011 Feb;18(2):128-34.

Niedermeyer H, Arnold W, Neubert WJ, Höfler H. Evidence of measles virus RNA in otosclerotic tissue. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 1994 1994 May-Jun;56(3):130-2.

Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, Lin LT, Sisson G, Tsao MS, et al. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog.* 2011 Aug;7(8):e1002240.

Okada H, Sato TA, Katayama A, Higuchi K, Shichijo K, Tsuchiya T, et al. Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch Virol.* 2001;146(5):859-74.

Olivé JM, Risi JB, De Quadros CA. National immunization days: experience in Latin America. *J Infect Dis.* 1997 Feb;175 Suppl 1:S189-93.

Oliveira MI, Figueiredo CA, Afonso AM, Santos FC, Lemos XR, Yu AL, et al. Resurgence of measles virus in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2012 Mar-Apr;54(2):113-4.

Oliveira SA, Siqueira MM, Camacho LA, Nogueira RM, Spinetti CC, Cubel Garcia RC, et al. The aetiology of maculopapular rash diseases in Niteroi, State of Rio de Janeiro, Brazil: implications for measles surveillance. *Epidemiol Infect.* 2001 Dec;127(3):509-16.

Oliveira SA, Siqueira MM, Camacho LA, Castro-Silva R, Bruno BF, Cohen BJ. Use of RT-PCR on oral fluid samples to assist the identification of measles cases during an outbreak. *Epidemiol Infect.* 2003 Feb;130(1):101-6.

OMS. Measles. Progress towards global control and regional elimination, 1998-1999. *Wkly Epidemiol Rec*, v. 74, n. 50, p. 429-34, 1999.

\_\_\_\_\_. Strategies for reducing global measles mortality. *Wkly Epidemiol Rec*, v. 75, n. 50, p. 411-6, 2000.

\_\_\_\_\_. Global reductions in measles mortality 2000-2008 and the risk of measles resurgence. *Wkly Epidemiol Rec*, v. 84, n. 49, p. 509-16, 2009a.

\_\_\_\_\_. Measles vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*, v. 84, n. 35, p. 349-60, 2009b.

\_\_\_\_\_. Monitoring progress towards measles elimination. *Wkly Epidemiol Rec*, v. 85, n. 49, p. 490-4, 2010.

\_\_\_\_\_. Measles virus nomenclature update: 2012. *Wkly Epidemiol Rec*, v. 87, n. 9, p. 73-81, 2012.

\_\_\_\_\_. Genetic diversity of wild-type measles viruses and the global measles nucleotide surveillance database (MeaNS). *Wkly Epidemiol Rec*, v. 90, n. 30, p. 373-80, 2015a.

\_\_\_\_\_. World Health Organization. Reported measles cases and incidence rates by WHO Member States 2013, 2014 as of 11 February 2015. 2015b

\_\_\_\_\_. Europe observes a 4-fold increase in measles cases in 2017 compared to previous year 2018a.

\_\_\_\_\_. Measles and Rubella Surveillance data 2018b.

\_\_\_\_\_. The role of extended and Whole genome sequencing for tracking transmission of measles and rubella viruses: report from the Global Measles and Rubella Laboratory Network meeting, 2017. *Wkly Epidemiol Rec*, v. 93, n. 6, p. 55-9, 2018c.

OMS, OPAS. Plan of action to ensure the sustainability of the elimination of sarampo, rubella and congenital rubella syndrome in the americas 2018-2023. Acessado em Setembro de 2017. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34196/CE160-16-e.pdf?sequence=1>.

OMS Europa. Observes a 4-fold increase in measles cases in 2017 compared to previous year. Acessado em Abril de 2018. Disponível em: <http://www.euro.who.int/en/media-centre/sections/press-releases/2018/europe-observes-a-4-fold-increase-in-measles-cases-in-2017-compared-to-previous-year>.

OPAS, OMS. Alerta epidemiológico – Surtos de sarampo, implicações para as Américas. 2015.

OPAS, OMS. Atualização Epidemiológica, Sarampo. 6 de fevereiro de 2018. Washington.

OPAS, OMS. Atualização Epidemiológica, Sarampo. 9 de março de 2018. Washington.

OPAS, OMS. Atualização Epidemiológica, Sarampo. 11 de Março de 2018. Washington.

Orenstein WA, Hinman A, Nkowane B, Olive JM, Reingold A. Measles and Rubella Global Strategic Plan 2012-2020 midterm review. *Vaccine*. 2018 01;36 Suppl 1:A1-A34.

Palosaari H, Parisien JP, Rodriguez JJ, Ulane CM, Horvath CM. STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol*. 2003 Jul;77(13):7635-44.

Pang M, Xu JY, Li P, Han XX, Li MY. Clinical analysis of 51 cases of atypical measles syndrome characterized by fever and multiple lung lesions. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2008 Oct;31(10):731-5.

Penedos AR, Myers R, Hadeef B, Aladin F, Brown KE. Assessment of the Utility of Whole Genome Sequencing of Measles Virus in the Characterisation of Outbreaks. *PLoS One*. 2015;10(11):e0143081.

Perry RT, Halsey NA. The clinical significance of measles: a review. *J Infect Dis*. 2004 May;189 Suppl 1:S4-16.

Petersen LR, Jamieson DJ, Honein MA. Zika Virus. *N Engl J Med*. 2016 Jul;375(3):294-5.

Pfaff G, Lohr D, Santibanez S, Mankertz A, van Treeck U, Schonberger K. Spotlight on measles 2010: Measles outbreak among travellers returning from a mass gathering, Germany, September to October 2010. *Euro Surveill*. 2010 Dec;15(50).

Porretta A, Quattrone F, Aquino F, Pieve G, Bruni B, Gemignani G, et al. A nosocomial measles outbreak in Italy, February-April 2017. *Euro Surveill.* 2017 Aug;22(33).

Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 2008 Jul;25(7):1253-6.

Prevots DR, Parise MS, Segatto TC, Siqueira MM, dos Santos ED, Ganter B, et al. Interruption of measles transmission in Brazil, 2000-2001. *J Infect Dis.* 2003 May;187 Suppl 1:S111-20.

Rall GF. Measles virus 1998-2002: progress and controversy. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:343-67.

Rambaut A, Suchard M, Drummond A. Programa Tracer. 2003. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>. Acessado em Fevereiro de 2017.

Rambaut. Programa FigTree. 2006. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Acessado em Fevereiro de 2017.

Rauh LW, Schmidt R. Measles immunization with killed virus vaccine. Serum antibody titers and experience with exposure to measles epidemic. *Am J Dis Child.* 1965 Mar;109:232-7.

Reutter GL, Cortese-Grogan C, Wilson J, Moyer SA. Mutations in the measles virus C protein that up regulate viral RNA synthesis. *Virology.* 2001 Jun;285(1):100-9.

Rima BK, Earle JA, Yeo RP, Herlihy L, Baczko K, ter Meulen V, et al. Temporal and geographical distribution of measles virus genotypes. *J Gen Virol.* 1995 May;76 ( Pt 5):1173-80.

\_\_\_\_\_. Sequence divergence of measles virus haemagglutinin during natural evolution and adaptation to cell culture. *J Gen Virol.* 1997 Jan;78 ( Pt 1):97-106.

Robbins FC. Measles: clinical features. Pathogenesis, pathology and complications. *Am J Dis Child.* 1962 Mar;103:266-73.

Rosen JB, Rota JS, Hickman CJ, Sowers SB, Mercader S, Rota PA, et al. Outbreak of measles among persons with prior evidence of immunity, New York City, 2011. *Clin Infect Dis.* 2014 May;58(9):1205-10.

Rota JS, Hummel KB, Rota PA, Bellini WJ. Genetic variability of the glycoprotein genes of current wild-type measles isolates. *Virology.* 1992 May;188(1):135-42.

Rota PA, Bloom AE, Vanchiere JA, Bellini WJ. Evolution of the nucleoprotein and matrix genes of wild-type strains of measles virus isolated from recent epidemics. *Virology.* 1994 Feb;198(2):724-30.

Rota PA, Khan AS, Durigon E, Yuran T, Villamarzo YS, Bellini WJ. Detection of measles virus RNA in urine specimens from vaccine recipients. *J Clin Microbiol*. 1995 Sep;33(9):2485-8.

Rota PA, Featherstone DA, Bellini WJ. Molecular epidemiology of measles virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;330:129-50.

Rota JS, Hickman CJ, Sowers SB, Rota PA, Mercader S, Bellini WJ. Two case studies of modified measles in vaccinated physicians exposed to primary measles cases: high risk of infection but low risk of transmission. *J Infect Dis*. 2011a Jul;204 Suppl 1:S559-63.

Rota PA, Brown K, Mankertz A, Santibanez S, Shulga S, Muller CP, et al. Global distribution of measles genotypes and measles molecular epidemiology. *J Infect Dis*. 2011b Jul;204 Suppl 1:S514-23.

Rota PA, Bankamp B. Whole-Genome Sequencing During Measles Outbreaks. *J Infect Dis*. 2015 Nov;212(10):1529-30.

Rota PA, Moss WJ, Takeda M, de Swart RL, Thompson KM, Goodson JL. Measles. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Jul 14;2:1-16.

Ruff TA. Immunisation strategies for viral diseases in developing countries. *Rev Med Virol*. 1999 Apr-Jun;9(2):121-38.

Sabella C. Measles: not just a childhood rash. *Cleve Clin J Med*. 2010 Mar;77(3):207-13.

Santibanez S, Tischer A, Heider A, Siedler A, Hengel H. Rapid replacement of endemic measles virus genotypes. *J Gen Virol*. 2002 Nov;83(Pt 11):2699-708.

Santibanez S, Prosenc K, Lohr D, Pfaff G, Jordan Markocic O, Jordan O, et al. Measles virus spread initiated at international mass gatherings in Europe, 2011. *Euro Surveill*. 2014;19(35).

Santibanez S, Hübschen JM, Muller CP, Freymuth F, Mosquera MM, Mamou MB, et al. Long-term transmission of measles virus in Central and continental Western Europe. *Virus Genes*. 2015 Feb;50(1):2-11.

Schneeweiss B, Pfliederer M, Keller-Stanislawski B. Vaccination safety update. *Dtsch Arztebl Int*. 2008 Aug;105(34-35):590-5.

Sedlmeier R, Neubert WJ. The replicative complex of paramyxoviruses: structure and function. *Adv Virus Res*. 1998;50:101-39.

Semenov BF, Onishchenko GG, Narkevich MI, Ganzenko VP. [The expanded immunization program: results, prospects, new problems]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 1996 Sep-Oct(5):110-3.

Seppälä E, Zöldi V, Vuorinen S, Murtopuro S, Elonsalo U, van Beek J, et al. A cluster of measles linked to an imported case, Finland, 2017. *Euro Surveill.* 2017 Aug;22(33).

Shaffer JA, Bellini WJ, Rota PA. The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology.* 2003 Oct;315(2):389-97.

Shannon M, Beaty BL. Constraints on the Genetic and Antigenic Variability of Measles Virus. *Viruses.* 2016.

Simons E, Ferrari M, Fricks J, Wannemuehler K, Anand A, Burton A, et al. Assessment of the 2010 global measles mortality reduction goal: results from a model of surveillance data. *Lancet.* 2012 Jun;379(9832):2173-8.

Siqueira MM, Castro-Silva R, Cruz C, Oliveira IC, Cunha GM, Mello M, et al. Genomic characterization of wild-type measles viruses that circulated in different states in Brazil during the 1997 measles epidemic. *J Med Virol.* 2001 Apr;63(4):299-304.

Siqueira M. Caracterização Molecular do vírus do sarampo detectados no surto da região nordeste do Brasil, 2013-2015. (arquivo pessoal) VI Simpósio Colombiano de Virologia Bogotá, 2015; Colombia.

Sparrer KM, Krebs S, Jäger G, Santibanez S, Mankertz A, Blum H, et al. Complete Genome Sequence of a Wild-Type Measles Virus Isolated during the Spring 2013 Epidemic in Germany. *Genome Announc.* 2014;2(2).

Sugerman DE, Barskey AE, Delea MG, Ortega-Sanchez IR, Bi D, Ralston KJ, Rota PA, Waters-Montijo K, Lebaron CW. Measles outbreak in a highly vaccinated population, San Diego, 2008: role of the intentionally undervaccinated. *2010 Pediatrics*, v. 125, n. 4.

Suryanarayana K, Baczko K, ter Meulen V, Wagner RR. Transcription inhibition and other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue. *J Virol.* 1994 Mar;68(3):1532-43.

Tahara M, Bürckert JP, Kanou K, Maenaka K, Muller CP, Takeda M. Measles Virus Hemagglutinin Protein Epitopes: The Basis of Antigenic Stability. *Viruses.* 2016 08;8(8).

Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 1993 May;10(3):512-26.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013 Dec;30(12):2725-9.

Taylor LE, Swerdfeger AL, Eslick GD. Vaccines are not associated with autism: an evidence-based meta-analysis of case-control and cohort studies. *Vaccine*. 2014 Jun;32(29):3623-9.

Thomas S, Hiebert J, Gubbay JB, Gournis E, Sharron J, Severini A, et al. Measles Outbreak with Unique Virus Genotyping, Ontario, Canada, 2015. *Emerg Infect Dis*. 2017 07;23(7):1063-9.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 1997 Dec;25(24):4876-82.

Thompson KM, Odahowski CL. Systematic Review of Health Economic Analyses of Measles and Rubella Immunization Interventions. *Risk Anal*. 2016 07;36(7):1297-314.

Thorne JL, Kishino H, Painter IS. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Mol Biol Evol*. 1998 Dec;15(12):1647-57.

Tischer A, Siedler A, Rasch G. [Surveillance of measles in Germany]. *Gesundheitswesen*. 2001 Nov;63(11):703-9.

Tosun S OA, Tansuq N. Adverse effects of single-component measles vaccine in school children. *Vaccine*. 2017.

Truong AT, Mulders MN, Gautam DC, Ammerlaan W, de Swart RL, King CC, et al. Genetic analysis of Asian measles virus strains--new endemic genotype in Nepal. *Virus Res*. 2001 Jul;76(1):71-8.

UNICEF, WHO. Levels and trends in child mortality 2015. 2015. Acessado em: Setembro de 2016. Disponível em: [http://www.who.int/maternal\\_child\\_adolescent/documents/levels\\_trends\\_child\\_mortality\\_2015/en/](http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/levels_trends_child_mortality_2015/en/).

Venczel L, Rota J, Dietz V, Morris-Glasgow V, Siqueira M, Quiroga E, et al. The Measles Laboratory Network in the region of the Americas. *J Infect Dis*. 2003 May 15;187 Suppl 1:S140-5.

Wild TF, Malvoisin E, Buckland R. Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J Gen Virol*. 1991 Feb;72 ( Pt 2):439-42.

Wolfson LJ, Grais RF, Luquero FJ, Birmingham ME, Strebel PM. Estimates of measles case fatality ratios: a comprehensive review of community-based studies. *Int J Epidemiol*. 2009 Feb;38(1):192-205.

Young LW, Smith DI, Glasgow LA. Pneumonia of atypical measles. Residual nodular lesions. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*. 1970 Nov;110(3):439-48.



Yeung LF, Lurie P, Dayan G, Eduardo E, Britz PH, Redd SB, et al. A limited measles outbreak in a highly vaccinated US boarding school. *Pediatrics*. 2005 Dec;116(6):1287-91.

Zahoor Zaidi SS, Hameed A, Ali N, Rana MS, Umair M, Alam MM, et al. Epidemiological and molecular investigation of a measles outbreak in Punjab Pakistan, 2013-2015. *J Med Virol*. 2018 Apr.

Zhang X, Oglesbee M. Use of surface plasmon resonance for the measurement of low affinity binding interactions between HSP72 and measles virus nucleocapsid protein. *Biol Proced Online*. 2003;5:170-81.

Zipprich J, Winter K, Hacker J, Xia D, Watt J, Harriman K, et al. Measles outbreak -California, December 2014-February 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2015 Feb;64(6):153-4.

## 10. ANEXOS

### 10.1 APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudos virológicos e imunológicos de Infecções respiratórias e exantemáticas na rede de vigilância do Laboratório de Virus Respiratórios e Sarampo

**Pesquisador:** Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 68118417.6.0000.5248

**Instituição Proponente:** FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ  
CNPQ  
Fundação Oswaldo Cruz

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.453.470

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo observacional a ser desenvolvido no Laboratório de Virus Respiratórios e Sarampo (LVRS) do IOC, Laboratório de Referência Nacional da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Ministério da Saúde para Influenza e Virose Exantemáticas e Regional da América Latina para a OMS utilizará amostras provenientes da rede de vigilância epidemiológica para os vírus respiratórios e exantemáticos. Serão realizados estudos sobre a circulação dos vírus no Brasil, a patogênese e resposta imune frente às infecções, através de análises de amostras respiratórias, de soro ou de urina provenientes da rede de vigilância de vírus respiratórios e exantemáticos recebidas pelo LVRS em fluxo contínuo ao longo do ano. As amostras de soro e urina da rede de vigilância de vírus exantemáticos serão utilizadas para ensaios sorológicos para sarampo, rubéola, caxumba e varicela. Serão utilizados também dados da ficha Sivep Gripe ou SRAG do Ministério da Saúde.

##### Objetivo da Pesquisa:

O estudo busca estudar fatores virais e de resposta imune de vírus respiratórios e exantemáticos em amostras provenientes da rede de vigilância de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), Síndrome Gripal (SG) e doenças exantemáticas recebidas pelo Laboratório de Virus Respiratórios e

Endereço: Av. Brasil 4096, Sala 705 (Campus Expansão)  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3882-0011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cep@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer 2.453.470

Sarampo (LVR5) do IOC/Fiocruz. Para este fim os autores pretendem estudar amostras clínicas de pacientes enviadas ao LVR5 através do sistema de vigilância SRAG universal e sentinela do Ministério da Saúde para vírus respiratórios e exantemáticos

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos e benefícios diretos e indiretos são avaliados no projeto e trazidos nos TCLE.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto suficientemente claro, bem fundamentado, sem necessidade de ser encaminhado para a CONEP. O estudo proposto parece pertinente e possui valor científico. A Metodologia é adequada e permitirá atingir o objetivo primário.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados e avaliados os seguintes documentos:

Carta resposta ao CEP assinada pela pesquisadora responsável, datada em 22/11/17 indicando ter atendido a todas as pendências inclusive traduzido o CV.

Informações básicas do projeto

Termos de assentimento Livre e Esclarecido (TALE), versões 3.0 de 28/11/2017, em papel com logotipo da Instituição, redigido em terceira pessoa.

Curriculum vitae (CV) de Aline da Rocha Matos

Cronograma. Indica que coleta de dados terá início em janeiro 2018.

**Recomendações:**

nenhuma

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

No conjunto o estudo parece adequado metodologicamente, e considera-se eticamente aceitável e em conformidade com a Resolução 466/2012 e Norma Operacional 01/2013 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

1. Projeto:

b. Esclarecer como serão tratados os dados de identificação dos pacientes contidos nas fichas do SIVEP. Sugere-se que sejam apagados ou cobertos nomes, endereço e telefone destas fichas.

Esclarecido sobre os cuidados e tratamento dos dados sigilosos das fichas.

Pendência atendida.

TCLEs e TALEs.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 2.453.470

2. No entanto deve explicar em linguagem adequada ao público alvo o texto adicionado, especialmente as "questões éticas da participação na pesquisa". Os pesquisadores explicaram e exemplificaram as questões éticas da participação na pesquisa.

Pendência atendida.

3. A assinatura do responsável deve ser retirada dos TALEs, somente precisa constar no TCLE para responsáveis e substituir a palavra "cópia" por "documento/foihas iguais". Lembrar que criança pequena pode não saber assinar, inserir local para colocar a digital, o mesmo caso se a população alvo inclui analfabetos.

Feitas as supressões e inserções requeridas.

Pendência atendida

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), em sua 234ª Reunião Ordinária, realizada em 12.12.2017, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_823022.pdf	30/11/2017 11:33:26		Aceito
Outros	TCLE_TALE_marcados_nov_17.pdf	30/11/2017 11:31:37	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Cronograma	cronogramaNov17.pdf	30/11/2017 11:31:04	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_resposta_22_11_17.pdf	30/11/2017 11:30:22	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_TALE_nov_17.pdf	30/11/2017 00:28:10	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Declaração do Patrocinador	Financiamentos_LVRS_completo_atual Set_17.pdf	05/09/2017 10:00:30	Marilda Agudo Mendonça Teixeira de Siqueira	Aceito
Orçamento	orcamento_detalhado.pdf	05/09/2017 10:00:15	Marilda Agudo Mendonça Teixeira	Aceito

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
 Telefone: (21)3882-0011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfio cruz@ioc.fiocruz.br

Página 02 de 04

Continuação do Parecer: 2.453.470

Orçamento	orcamento_detalhado.pdf	05/09/2017 10:00:15	de Siqueira	Aceito
Brochura Pesquisa	ProjetoCEPLVRSsetembro17sem_marcacao.pdf	05/09/2017 09:53:03	Marilda Agudo Mendonça Telxela de Siqueira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEPLVRSsetembro17.pdf	04/09/2017 18:41:12	Marilda Agudo Mendonça Telxela de Siqueira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso_Sigilo_LVRS_assinado.pdf	03/05/2017 21:00:30	Marilda Agudo Mendonça Telxela de Siqueira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regimento_Biorepositório_LVRS_assinado.pdf	03/05/2017 20:56:44	Marilda Agudo Mendonça Telxela de Siqueira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Instituicao_assinada.pdf	03/05/2017 20:53:49	Marilda Agudo Mendonça Telxela de Siqueira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada_LVRS.pdf	03/05/2017 20:51:36	Marilda Agudo Mendonça Telxela de Siqueira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 21 de Dezembro de 2017

Assinado por:  
José Henrique da Silva Pilotto  
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4366, Sala 705 (Campus Expansão)  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfio cruz@ioc.fiocruz.br

Página 04 de 04

## 10.2 NÚMERO DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS BRASILEIRAS REPORTADAS NO MEANS E GENBANK

Identificação	Número de	Nomenclatura MeaNS/ OMS	UF	Genotipo	Data de
20130004	40466	MMeV/SaoPaulo.BRA/52.12	SP	D8	02-Out-2013
20130005	40467	MMeV/MinasGerais.BRA/2.13	MG	D8	02-Out-2013
20130028	40468	MMeV/SaoPaulo.BRA/2.13	SP	D8	02-Out-2013
20130060	KF738753/ 40745	MMeV/Pernambuco.BRA/13.13	PE	D8	05-Mai-2014
20130061	KF738754	MMeV/Pernambuco.BRA/12.13	PE	D8	05-Mai-2014
20130062	KF738755	MMeV/Pernambuco.BRA/14.13	PE	D8	05-Mai-2014
20130075	KF738756	MMeV/Pernambuco.BRA/15.13	PE	D8	05-Mai-2014
20130078	KF738757	MMeV/Pernambuco.BRA/16.13	PE	D8	05-Mai-2014
20130080	KF738758	MMeV/Pernambuco.BRA/16.13/2	PE	D8	05-Mai-2014
20130081	KF738759	MMeV/Pernambuco.BRA/12.13/2	PE	D8	05-Mai-2014
20130082	KF738760	MMeV/Pernambuco.BRA/16.13/3	PE	D8	05-Mai-2014
20130083	KF738761	MMeV/Pernambuco.BRA/16.13/4	PE	D8	05-Mai-2014
20130085	KF738762	MMeV/Pernambuco.BRA/15.13/2	PE	D8	05-Mai-2014
20130089	KF738763	MMeV/Pernambuco.BRA/16.13/5	PE	D8	05-Mai-2014
20130090	KF738764	MMeV/Pernambuco.BRA/17.13	PE	D8	05-Mai-2014
20130091	KF738765	MMeV/Pernambuco.BRA/18.13/2	PE	D8	05-Mai-2014
20130092	KF738766	MMeV/Pernambuco.BRA/17.13/2	PE	D8	05-Mai-2014
20130108	40469	MMeV/SantaCatarina.BRA/18.13	SC	D8	02-Out-2013
20130110	40470	MMeV/Paraiba.BRA/21.13	PB	D8	02-Out-2013
20130112	KF738767	MMeV/Pernambuco.BRA/18.13/3	PE	D8	05-Mai-2014
20130115	KF738768	MMeV/Pernambuco.BRA/18.13/4	PE	D8	05-Mai-2014
20130117	KF738769	MMeV/Pernambuco.BRA/19.13	PE	D8	05-Mai-2014
20130118	KF738770	MMeV/Pernambuco.BRA/18.13/5	PE	D8	05-Mai-2014
20130119	KF738771	MMeV/Pernambuco.BRA/18.13/6	PE	D8	05-Mai-2014
20130120	KF738772	MMeV/Pernambuco.BRA/18.13/7	PE	D8	05-Mai-2014
20130123	KF738773	MMeV/Pernambuco.BRA/19.13/2	PE	D8	05-Mai-2014
20130124	KF738774	MMeV/Pernambuco.BRA/18.13/8	PE	D8	05-Mai-2014
20130131	KF738775	MMeV/Pernambuco.BRA/18.13/9	PE	D8	05-Mai-2014
20130136	KF738776	MMeV/Pernambuco.BRA/19.13/3	PE	D8	05-Mai-2014
20130148	KF738777	MMeV/Pernambuco.BRA/19.13/4	PE	D8	05-Mai-2014
20130150	KF738778	MMeV/Pernambuco.BRA/19.13/5	PE	D8	05-Mai-2014
20130156	40523	MMeV/Paraiba.BRA/21.13/2	PB	D8	04-Out-2013
20130157	40784	MMeV/SaoPaulo.BRA/21.13/5	SP	D4	10-Out-2013
20130158	KF738779	MMeV/Pernambuco.BRA/20.13	PE	D8	05-Mai-2014
20130159	KF738780	MMeV/Pernambuco.BRA/20.13/2	PE	D8	05-Mai-2014
20130160	KF738781	MMeV/Pernambuco.BRA/20.13/3	PE	D8	05-Mai-2014
20130161	KF738782	MMeV/Pernambuco.BRA/19.13/6	PE	D8	05-Mai-2014
20130162	KF738783	MMeV/Pernambuco.BRA/20.13/4	PE	D8	05-Mai-2014
20130163	KF738784	MMeV/Pernambuco.BRA/20.13/5	PE	D8	05-Mai-2014
20130164	KF738785	MMeV/Pernambuco.BRA/19.13/7	PE	D8	05-Mai-2014
20130165	KF738786	MMeV/Pernambuco.BRA/19.13/8	PE	D8	05-Mai-2014
20130167	KF738787	MMeV/Pernambuco.BRA/19.13/9	PE	D8	05-Mai-2014
20130190	40746	MMeV/Paraiba.BRA/22.13/3	PB	D8	07-Out-2013
20130191	40747	MMeV/Paraiba.BRA/22.13/4	PB	D8	07-Out-2013
20130194	40748	MMeV/Paraiba.BRA/22.13/6	PB	D8	07-Out-2013
20130197	40749	MMeV/Paraiba.BRA/22.13/5	PB	D8	07-Out-2013
20130203	40524	MMeV/Pernambuco.BRA/21.13/3	PE	D8	04-Out-2013
20130204	KF738789	MMeV/Pernambuco.BRA/21.13/4	PE	D8	05-Mai-2014

20130205	KF738790	MMeV/Pernambuco.BRA/19.13/10	PE	D8	05-Mai-2014
20130206	40750	MMeV/Pernambuco.BRA/22.13	PE	D8	08-Out-2013
20130208	40751	MMeV/Pernambuco.BRA/23.13	PE	D8	08-Out-2013
20130209	40752	MMeV/Pernambuco.BRA/23.13/2	PE	D8	08-Out-2013
20130210	40753	MMeV/Pernambuco.BRA/23.13/3	PE	D8	08-Out-2013
20130212	40754	MMeV/Pernambuco.BRA/20.13/6	PE	D8	08-Out-2013
20130213	40755	MMeV/Pernambuco.BRA/23.13/4	PE	D8	08-Out-2013
20130214	40756	MMeV/Pernambuco.BRA/22.13/2	PE	D8	08-Out-2013
20130235	40757	MMeV/Paraiba.BRA/24.13/3	PB	D8	08-Out-2013
20130258	40758	MMeV/Pernambuco.BRA/24.13	PE	D8	08-Out-2013
20130259	40763	MMeV/Pernambuco.BRA/24.13/2	PE	D8	08-Out-2013
20130261	40764	MMeV/Pernambuco.BRA/25.13	PE	D8	08-Out-2013
20130262	40765	MMeV/Pernambuco.BRA/25.13/2	PE	D8	08-Out-2013
20130266	40766	MMeV/Pernambuco.BRA/25.13/3	PE	D8	08-Out-2013
20130267	40767	MMeV/Pernambuco.BRA/25.13/4	PE	D8	08-Out-2013
20130268	40768	MMeV/Pernambuco.BRA/26.13	PE	D8	08-Out-2013
20130270	40772	MMeV/Pernambuco.BRA/25.13/5	PE	D8	09-Out-2013
20130271	40773	MMeV/Pernambuco.BRA/26.13/4	PE	D8	09-Out-2013
20130272	40774	MMeV/Pernambuco.BRA/25.13/6	PE	D8	09-Out-2013
20130273	40775	MMeV/Pernambuco.BRA/26.13/2	PE	D8	09-Out-2013
20130275	40776	MMeV/Pernambuco.BRA/26.13/3	PE	D8	09-Out-2013
20130276	40777	MMeV/Pernambuco.BRA/27.13	PE	D8	09-Out-2013
20130295	40778	MMeV/Pernambuco.BRA/27.13/2	PE	D8	09-Out-2013
20130296	40779	MMeV/Pernambuco.BRA/28.13	PE	D8	09-Out-2013
20130300	40780	MMeV/Pernambuco.BRA/28.13/2	PE	D8	09-Out-2013
20130301	40781	MMeV/Pernambuco.BRA/28.13/3	PE	D8	09-Out-2013
20130302	40782	MMeV/Pernambuco.BRA/27.13/3	PE	D8	10-Out-2013
20130303	41021	MMeV/Pernambuco.BRA/27.13/4	PE	D8	17-Out-2013
20130304	40783	MMeV/Pernambuco.BRA/29.13	PE	D8	10-Out-2013
20130355	40785	MMeV/DistritoFederal.BRA/29.13/2	DF	B3	10-Out-2013
20130382	41022	MMeV/Pernambuco.BRA/29.13/3	PE	D8	18-Out-2013
20130384	41289	MMeV/Pernambuco.BRA/30.13	PE	D8	27-Out-2013
20130387	41290	MMeV/Pernambuco.BRA/30.13/2	PE	D8	27-Out-2013
20130395	41291	MMeV/Pernambuco.BRA/31.13	PE	D8	27-Out-2013
20130396	41292	MMeV/Pernambuco.BRA/31.13/2	PE	D8	27-Out-2013
20130512	41293	MMeV/Pernambuco.BRA/32.13	PE	D8	27-Out-2013
20130567	41024	MMeV/Pernambuco.BRA/33.13	PE	D8	18-Out-2013
20130588	41025	MMeV/Pernambuco.BRA/34.13	PE	D8	18-Out-2013
20130599	41026	MMeV/Pernambuco.BRA/35.13	PE	D8	18-Out-2013
20130601	41294	MMeV/Pernambuco.BRA/36.13	PE	D8	27-Out-2013
20130609	41295	MMeV/Pernambuco.BRA/38.13	PE	D8	27-Out-2013
20130640	41296	MMeV/Pernambuco.BRA/39.13	PE	D8	27-Out-2013
20130672	43279	MMeV/Pernambuco.BRA/38.13/2	PE	D8	10-Dez-2013
20130701	43280	MMeV/Pernambuco.BRA/42.13	PE	D8	10-Dez-2013
20130702	43281	MMeV/Pernambuco.BRA/43.13	PE	D8	10-Dez-2013
20130706	43282	MMeV/Pernambuco.BRA/43.13/2	PE	D8	10-Dez-2013
20130707	43283	MMeV/Pernambuco.BRA/43.13/3	PE	D8	10-Dez-2013
20130711	43284	MMeV/Pernambuco.BRA/45.13/2	PE	D8	10-Dez-2013
20130712	43287	MMeV/Pernambuco.BRA/46.13	PE	D8	12-Dez-2013
20130715	43288	MMeV/Pernambuco.BRA/45.13/3	PE	D8	10-Dez-2013
20130716	43289	MMeV/Pernambuco.BRA/45.13/4	PE	D8	10-Dez-2013
20130744	44470	MMeV/Pernambuco.BRA/45.13/5	PE	D8	14-Jan-2014
20130745	44471	MMeV/Pernambuco.BRA/47.13	PE	D8	14-Jan-2014
20130779	44472	MMeV/Pernambuco.BRA/45.13/6	PE	D8	14-Jan-2014

20130780	44473	MMeV/Pernambuco.BRA/47.13/2	PE	D8	14-Jan-2014
20130783	44474	MMeV/Pernambuco.BRA/48.13	PE	D8	14-Jan-2014
20130787	44475	MMeV/Pernambuco.BRA/48.13/2	PE	D8	14-Jan-2014
20130800	44476	MMeV/Pernambuco.BRA/48.13/3	PE	D8	14-Jan-2014
20130801	44477	MMeV/Pernambuco.BRA/49.13	PE	D8	14-Jan-2014
20140001	47024	MMeV/EspiritoSanto.BRA/50.13	ES	D8	24-Mar-2014
20140004	47025	MMeV/Pernambuco.BRA/50.13/2	PE	D8	24-Mar-2014
20140006	47026	MMeV/Pernambuco.BRA/50.13/3	PE	D8	24-Mar-2014
20140007	47079	MMeV/Pernambuco.BRA/49.13/2	PE	D8	26-Mar-2014
20140009	51203	MMeV/Pernambuco.BRA/49.13/4	PE	D8	04-Jul-2014
20140028	46766	MMeV/Ceara.BRA/2.14	CE	D8	18-Mar-2014
20140030	47027	MMeV/Pernambuco.BRA/50.13/4	PE	D8	24-Mar-2014
20140031	47028	MMeV/Pernambuco.BRA/51.13	PE	D8	24-Mar-2014
20140032	47029	MMeV/Pernambuco.BRA/47.13/3	PE	D8	24-Mar-2014
20140036	47030	MMeV/Pernambuco.BRA/45.13/7	PE	D8	24-Mar-2014
20140046	47031	MMeV/Pernambuco.BRA/50.13/5	PE	D8	24-Mar-2014
20140051	47032	MMeV/Pernambuco.BRA/49.13/3	PE	D8	24-Mar-2014
20140060	46767	MMeV/Ceara.BRA/2.14/4	CE	D8	18-Mar-2014
20140062	46768	MMeV/Ceara.BRA/2.14/5	CE	D8	18-Mar-2014
20140063	46769	MMeV/Ceara.BRA/2.14/6	CE	D8	18-Mar-2014
20140064	46770	MMeV/Ceara.BRA/3.14/2	CE	D8	18-Mar-2014
20140065	46771	MMeV/Ceara.BRA/3.14/3	CE	D8	18-Mar-2014
20140067	46772	MMeV/Ceara.BRA/3.14/4	CE	D8	18-Mar-2014
20140068	46773	MMeV/Ceara.BRA/3.14	CE	D8	18-Mar-2014
20140113	46774	MMeV/Ceara.BRA/2.14/3	CE	D8	18-Mar-2014
20140114	46775	MMeV/Ceara.BRA/4.14	CE	D8	18-Mar-2014
20140107	51204	MMeV/Pernambuco.BRA/52.13/3	PE	D8	04-Jul-2014
20140109	51205	MMeV/Pernambuco.BRA/3.14/10	PE	D8	04-Jul-2014
20140061	47033	MMeV/Ceara.BRA/2.14/2	CE	D8	24-Mar-2014
20140115	47034	MMeV/Ceara.BRA/3.14/5	CE	D8	24-Mar-2014
20140116	47035	MMeV/Ceara.BRA/52.13	CE	D8	24-Mar-2014
20140117	47080	MMeV/Ceara.BRA/4.14/2	CE	D8	26-Mar-2014
20140118	47081	MMeV/Ceara.BRA/5.14	CE	D8	26-Mar-2014
20140120	47082	MMeV/Ceara.BRA/5.14/2	CE	D8	26-Mar-2014
20140122	47083	MMeV/Ceara.BRA/1.14	CE	D8	26-Mar-2014
20140125	47084	MMeV/Ceara.BRA/3.14/6	CE	D8	26-Mar-2014
20140126	47085	MMeV/Ceara.BRA/4.14/3	CE	D8	26-Mar-2014
20140127	47086	MMeV/Ceara.BRA/4.14/4	CE	D8	26-Mar-2014
20140095	47087	MMeV/Ceara.BRA/50.13/6	CE	D8	26-Mar-2014
20140128	47089	MMeV/Ceara.BRA/3.14/7	CE	D8	26-Mar-2014
20140129	47090	MMeV/Ceara.BRA/3.14/8	CE	D8	26-Mar-2014
20140131	47097	MMeV/Ceara.BRA/4.14/5	CE	D8	27-Mar-2014
20140132	47098	MMeV/Ceara.BRA/4.14/6	CE	D8	27-Mar-2014
20140133	47099	MMeV/Ceara.BRA/4.14/7	CE	D8	27-Mar-2014
20140139	47100	MMeV/Ceara.BRA/4.14/8	CE	D8	27-Mar-2014
20140140	47101	MMeV/Ceara.BRA/5.14/4	CE	D8	27-Mar-2014
20140159	47103	MMeV/Ceara.BRA/5.14/5	CE	D8	27-Mar-2014
20140161	47104	MMeV/Ceara.BRA/5.14/6	CE	D8	27-Mar-2014
20140146	47102	MMeV/Pernambuco.BRA/52.13/2	PE	D8	27-Mar-2014
20140158	47088	MMeV/SaoPaulo.BRA/5.14/3	SP	D8	26-Mar-2014
20140124	51215	MMeV/Ceara,BRA/4.14/11	CE	D8	04-Jul-2014
20140160	51216	MMeV/Ceara.BRA/5.14/8	CE	D8	05-Jul-2014
20140162	51217	MMeV/Ceara.BRA/5.14/9	CE	D8	05-Jul-2014
20140163	51218	MMeV/Ceara.BRA/5.14/10	CE	D8	05-Jul-2014



20140164	51219	MMeV/Ceara.BRA/5.14/11	CE	D8	05-Jul-2014
20140165	51220	MMeV/Ceara.BRA/5.14/12	CE	D8	05-Jul-2014
20140167	51206	MMeV/Pernambuco.BRA/4.14/10	PE	D8	04-Jul-2014
20140170	47105	MMeV/Pernambuco.BRA/4.14/9	PE	D8	27-Mar-2014
20140171	51207	MMeV/Pernambuco.BRA/6.14/3	PE	D8	04-Jul-2014
20140175	51221	MMeV/Pernambuco.BRA/7.14/3	PE	D8	05-Jul-2014
20140179	51208	MMeV/Pernambuco.BRA/48.13/4	PE	D8	04-Jul-2014
20140187	51209	MMeV/Pernambuco.BRA/45.13/8	PE	D8	04-Jul-2014
20140191	51210	MMeV/Pernambuco.BRA/1.14/2	PE	D8	04-Jul-2014
20140192	51211	MMeV/Pernambuco.BRA/49.13/5	PE	D8	04-Jul-2014
20140198	52926	MMeV/SaoPaulo.BRA/6.14/2	SP	D8	30-Jul-2014
20140199	52927	MMeV/SaoPaulo.BRA/5.14/7	SP	D8	30-Jul-2014
20140200	52928	MMeV/SaoPaulo.BRA/6.14	SP	D8	31-Jul-2014
20140201	52929	MMeV/SaoPaulo.BRA/7.14	SP	D8	31-Jul-2014
20140210	51212	MMeV/Pernambuco.BRA/8.14/3	PE	D8	04-Jul-2014
20140212	51213	MMeV/Pernambuco.BRA/4.14/12	PE	D8	04-Jul-2014
20140236	51222	MMeV/Ceara.BRA/7.14/2	CE	D8	05-Jul-2014
20140237	51223	MMeV/Ceara.BRA/8.14	CE	D8	05-Jul-2014
20140240	51224	MMeV/Ceara.BRA/8.14/2	CE	D8	05-Jul-2014
20140299	51225	MMeV/Ceara.BRA/14.14	CE	D8	05-Jul-2014
20140262	128624	MMeV/SaoPaulo.BRA/13.14	SP	B3	07-Mai-2018
20140300	51226	MMeV/Ceara.BRA/15.14	CE	D8	05-Jul-2014
20140242	51227	MMeV/Ceara.BRA/4.14/13	CE	D8	05-Jul-2014
20140276	52930	MMeV/Ceara.BRA/9.14	CE	D8	31-Jul-2014
20140277	52931	MMeV/Ceara.BRA/10.14	CE	D8	31-Jul-2014
20140278	52932	MMeV/Ceara.BRA/12.14	CE	D8	31-Jul-2014
20140354	52933	MMeV/Ceara.BRA/21.14	CE	D8	31-Jul-2014
20140356	52934	MMeV/Ceara.BRA/19.14	CE	D8	31-Jul-2014
20140384	60030	MMeV/Ceara.BRA/22.14	CE	D8	09-Jan-2015
20140385	60031	MMeV/Ceara.BRA/24.14	CE	D8	09-Jan-2015
20140433	60032	MMeV/Ceara.BRA/28.14	CE	D8	09-Jan-2015
20140436	60033	MMeV/Ceara.BRA/29.14	CE	D8	09-Jan-2015
20140437	60034	MMeV/Ceara.BRA/29.14/2	CE	D8	09-Jan-2015
20140439	60035	MMeV/Ceara.BRA/29.14/3	CE	D8	09-Jan-2015
20140481	60036	MMeV/Ceara.BRA/31.14	CE	D8	09-Jan-2015
20140482	60037	MMeV/Ceara.BRA/30.14	CE	D8	09-Jan-2015
20140483	60038	MMeV/Ceara.BRA/32.14	CE	D8	09-Jan-2015
20140484	60039	MMeV/Ceara.BRA/35.14	CE	D8	09-Jan-2015
20140487	60041	MMeV/Ceara.BRA/33.14	CE	D8	09-Jan-2015
20140488	60042	MMeV/Ceara.BRA/30.14/2	CE	D8	09-Jan-2015
20140564	60045	MMeV/Ceara.BRA/37.14/3	CE	D8	09-Jan-2015
20140498	60043	MMeV/RiodeJaneiro.BRA/37.14	RJ	D8	09-Jan-2015
20140503	60044	MMeV/RiodeJaneiro.BRA/37.14/2	RJ	D8	09-Jan-2015
20140566	60047	MMeV/Ceara.BRA/42.14	CE	D8	09-Jan-2015
20150001	70236	MMeV/Ceara.BRA/48.14	CE	D8	17-Jun-2015
20150002	70237	MMeV/Ceara.BRA/48.14/2	CE	D8	17-Jun-2015
20150003	70238	MMeV/Ceara.BRA/48.14/3	CE	D8	17-Jun-2015
20150004	70239	MMeV/Ceara.BRA/46.14/2	CE	D8	17-Jun-2015
20150006	70240	MMeV/Ceara.BRA/51.14	CE	D8	17-Jun-2015
20150007	70241	MMeV/Ceara.BRA/48.14/4	CE	D8	17-Jun-2015
20150008	70242	MMeV/Ceara.BRA/50.14	CE	D8	17-Jun-2015
20150009	70243	MMeV/Ceara.BRA/52.14	CE	D8	17-Jun-2015
20150010	70244	MMeV/Ceara.BRA/50.14/2	CE	D8	17-Jun-2015
20150068	70248	MMeV/Ceara.BRA/2.15/2	CE	D8	19-Jun-2015

20150079	70249	MMeV/Ceara.BRA/4.15/2	CE	D8	19-Jun-2015
20150080	70250	MMeV/Ceara.BRA/4.15/3	CE	D8	19-Jun-2015
20150081	70251	MMeV/Ceara.BRA/1.15/3	CE	D8	19-Jun-2015
20150095	70252	MMeV/Ceara.BRA/6.15	CE	D8	19-Jun-2015
20150097	70253	MMeV/Ceara.BRA/5.15/2	CE	D8	19-Jun-2015
20150098	70254	MMeV/Ceara.BRA/7.15	CE	D8	19-Jun-2015
20150099	70255	MMeV/Ceara.BRA/8.15	CE	D8	19-Jun-2015
20150100	70256	MMeV/Ceara.BRA/3.15	CE	D8	19-Jun-2015
20150157	70257	MMeV/Ceara.BRA/14.15	CE	D8	19-Jun-2015
20150158	70258	MMeV/Ceara.BRA/10.15/2	CE	D8	19-Jun-2015
20150159	70259	MMeV/Ceara.BRA/8.15/2	CE	D8	19-Jun-2015
20150160	70260	MMeV/Ceara.BRA/10.15	CE	D8	19-Jun-2015
20150161	70716	MMeV/Ceara.BRA/11.15	CE	D8	26-Jun-2015 no MeaNS foi digitado 20140161
20150162	70717	MMeV/Ceara.BRA/12.15	CE	D8	26-Jun-2015 no MeaNS foi digitado 20140162
20150220	70719	MMeV/Ceara.BRA/14.15/3	CE	D8	26-Jun-2015
20150222	70720	MMeV/Ceara.BRA/16.15	CE	D8	26-Jun-2015
20150223	70721	MMeV/Ceara.BRA/19.15	CE	D8	26-Jun-2015
20150011	70986	MMeV/Ceara.BRA/49.14	CE	D8	30-Jun-2015
20150012	70987	MMeV/Ceara.BRA/51.14/2	CE	D8	30-Jun-2015
20150014	70988	MMeV/Ceara.BRA/49.14/2	CE	D8	30-Jun-2015
20150015	70989	MMeV/Ceara.BRA/50.14/3	CE	D8	30-Jun-2015
20150016	70990	MMeV/Ceara.BRA/51.14/3	CE	D8	30-Jun-2015
20150017	70991	MMeV/Ceara.BRA/49.14/3	CE	D8	30-Jun-2015
20150018	70992	MMeV/Ceara.BRA/50.14/4	CE	D8	30-Jun-2015
20150019	70993	MMeV/Ceara.BRA/50.14/5	CE	D8	30-Jun-2015
20150020	70994	MMeV/Ceara.BRA/49.14/4	CE	D8	30-Jun-2015
20150057	70995	MMeV/Ceara.BRA/49.14/5	CE	D8	30-Jun-2015
20150058	70996	MMeV/Ceara.BRA/52.14/3	CE	D8	30-Jun-2015
20150059	70997	MMeV/Ceara.BRA/53.14	CE	D8	30-Jun-2015
20150061	70998	MMeV/Ceara.BRA/51.14/4	CE	D8	30-Jun-2015
20150060	71005	MMeV/Ceara.BRA/1.15	CE	D8	02-Jul-2015
20150062	71006	MMeV/Ceara.BRA/53.14/3	CE	D8	02-Jul-2015
20150063	71007	MMeV/Ceara.BRA/51.14/5	CE	D8	02-Jul-2015
20150065	71009	MMeV/Ceara.BRA/52.14/5	CE	D8	02-Jul-2015
20150066	71010	MMeV/Ceara.BRA/53.14/4	CE	D8	02-Jul-2015
20140363	78757	MMeV/Ceara.BRA/20.14	CE	D8	01-Dez-2015
20140514	78758	MMeV/Ceara.BRA/31.14/2	CE	D8	01-Dez-2015
20140515	78759	MMeV/Ceara.BRA/36.14	CE	D8	01-Dez-2015
20140516	78760	MMeV/Ceara.BRA/36.14/2	CE	D8	01-Dez-2015
20140567	82172	MMeV/Ceara.BRA/37.14/4	CE	D8	19-Fev-2016
20140569	82173	MMeV/Ceara.BRA/33.14/2	CE	D8	19-Fev-2016
20140590	82777	MMeV/Ceara.BRA/41.14	CE	D8	03-Mar-2016
20140592	82778	MMeV/Ceara.BRA/44.14	CE	D8	03-Mar-2016
20140593	82779	MMeV/Ceara.BRA/46.14	CE	D8	03-Mar-2016
20140598	82780	MMeV/Ceara.BRA/45.14	CE	D8	03-Mar-2016
20150013	82781	MMeV/Ceara.BRA/52.14/2	CE	D8	03-Mar-2016
20150028	83099	MMeV/Roraima.BRA/1.15/2	CE	D8	08-Mar-2016
20150067	83100	MMeV/Ceara.BRA/2.15	CE	D8	08-Mar-2016
20150075	83101	MMeV/Ceara.BRA/2.15/3	CE	D8	08-Mar-2016
20150078	83102	MMeV/Ceara.BRA/4.15	CE	D8	08-Mar-2016

20150096	83103	MMeV/Ceara.BRA/5.15	CE	D8	08-Mar-2016
20150265	83104	MMeV/Ceara.BRA/19.15/2	CE	D8	08-Mar-2016

## 10.3 SEQUÊNCIAS D8 CONSENSO REPRESENTATIVAS E SUAS SEQUÊNCIAS IDÊNTICAS REPRESENTADAS PARA OS 450 NUCLEOTÍDEOS DO GENE N

N	Amostra consenso representante na árvore	Sequências idênticas representadas
25	13Seq_MMeV/Recife_PE.BRA/16.13/2_a_25.13  12Seq_MMeV/Goiana_PE.BRA/19.13/4_a_30.13	MMeV/Recife_PE.BRA/25.13/2; MMeV/Recife_PE.BRA/24.13; MMeV/Recife_PE.BRA/23.13/2; MMeV/Recife_PE.BRA/20.13/5; MMeV/Recife_PE.BRA/19.13/7; MMeV/Recife_PE.BRA/19.13/3; MMeV/Recife_PE.BRA/19.13/2; MMeV/Recife_PE.BRA/18.13/7; MMeV/Recife_PE.BRA/18.13/6; MMeV/Recife_PE.BRA/18.13/3; MMeV/Recife_PE.BRA/18.13; MMeV/Recife_PE.BRA/16.13/2 MMeV/Recife_PE.BRA/4.14/9 MMeV/Goiana_PE.BRA/30.13; MMeV/Goiana_PE.BRA/29.13; MMeV/Goiana_PE.BRA/28.13; MMeV/Goiana_PE.BRA/26.13/3; MMeV/Goiana_PE.BRA/26.13/2; MMeV/Goiana_PE.BRA/26.13; MMeV/Goiana_PE.BRA/25.13/5; MMeV/Goiana_PE.BRA/25.13/4; MMeV/Goiana_PE.BRA/20.13/2; MMeV/Goiana_PE.BRA/20.13; MMeV/Goiana_PE.BRA/19.13/4 MMeV/Goiana_PE.BRA/45.13/4
4	2Seq_MMeV/Bauru_SP.BRA/52.12_2.13 2Seq_MMeV/Camaragibe_PE.BRA/18.13_19.13/9	MMeV/Bauru_SP.BRA/52.12; MMeV/Bauru_SP.BRA/2.13 MMeV/Camaragibe_PE.BRA/18.13; MMeV/Camaragibe_PE.BRA/19.13/9
10	2Seq_MMeV/Martinopolis_CE.BRA/37.14/3_37.14/4  2Seq_MMeV/Itapipoca_CE.BRA/5.14/9_9.14 2Seq_MMeV/RiodeJaneiro_RJ.BRA/37.14_37.14/2  2Seq_MMeV/Sobral_CE.BRA/22.14_24.14 2Seq_MMeV/SenadorSa_CE.BRA/46.14_48.14	MMeV/Martinopolis_CE.BRA/37.14/3; MMeV/Martinopolis_CE.BRA/37.14/4 MMeV/Itapipoca_CE.BRA/9.14; MMeV/Itapipoca_CE.BRA/5.14/9 MMeV/RiodeJaneiro_RJ.BRA/37.14; MMeV/RiodeJaneiro_RJ.BRA/37.14/2 MMeV/Sobral_CE.BRA/22.14; MMeV/Sobral_CE.BRA/24.14 MMeV/SenadorSa_CE.BRA/46.14; MMeV/SenadorSa_CE.BRA/48.14
5	2Seq_MMeV/Trairi_CE.BRA/5.14/11_5.14/12 3Seq_MMeV/Caucaia_CE.BRA/48.14_14.15/3	MMeV/Trairi_CE.BRA/5.14/12; MMeV/Trairi_CE.BRA/5.14/11 MMeV/Caucaia_CE.BRA/49.14/4; MMeV/Caucaia_CE.BRA/48.14; MMeV/Caucaia_CE.BRA/14.15/3
8	3Seq_MMeV/Escada_PE.BRA/32.13_a_36.13  4Seq_MMeV/JaboataoDosGuararapes_PE.BRA/31.13_a_48.13 3	MMeV/Escada_PE.BRA/32.13; MMeV/Escada_PE.BRA/34.13; MMeV/Escada_PE.BRA/36.13 MMeV/JaboataoDosGuararapes_PE.BRA/31.13; MMeV/JaboataoDosGuararapes_PE.BRA/43.13/2; MMeV/JaboataoDosGuararapes_PE.BRA/43.13/3; MMeV/JaboataoDosGuararapes_PE.BRA/48.13
17	8Seq_MMeV/Goiana_PE.BRA/45.13_a_01.14  9Seq_MMeV/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/25.13/6_a_38.13 3	MMeV/Goiana_PE.BRA/45.13/3; MMeV/Goiana_PE.BRA/47.13/3; MMeV/Goiana_PE.BRA/48.13; MMeV/Goiana_PE.BRA/49.13; MMeV/Goiana_PE.BRA/49.13/3; MMeV/Goiana_PE.BRA/50.13; MMeV/Goiana_PE.BRA/52.13; MMeV/Goiana_PE.BRA/1.14/2 MMeV/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/25.13/6; MMeV/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/27.13/2; MMeV/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/27.13/3; MMeV/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/27.13/4; MMeV/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/28.13/3; MMeV/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/29.13/3; MMeV/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/31.13/2; MMeV/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/35.13; MMeV/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/38.13
3	3Seq_MMeV/Fortaleza_CE.BRA/15.14_a_21.14	MMeV/Fortaleza_CE.BRA/15.14; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/19.14; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/21.14
2	2Seq_MMeV/Fortaleza_CE.BRA/10.14_12.14	MMeV/Fortaleza_CE.BRA/10.14; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/12.14
22	22Seq_MMeV/Recife_PE.BRA/30.13_a_8.14	MMeV/Recife_PE.BRA/30.13/2; MMeV/Recife_PE.BRA/42.13; MMeV/Recife_PE.BRA/43.13; MMeV/Recife_PE.BRA/45.13; MMeV/Recife_PE.BRA/45.13/2; MMeV/Recife_PE.BRA/45.13/7; MMeV/Recife_PE.BRA/45.13/8; MMeV/Recife_PE.BRA/46.13; MMeV/Recife_PE.BRA/47.13; MMeV/Recife_PE.BRA/47.13/2; MMeV/Recife_PE.BRA/48.13/2; MMeV/Recife_PE.BRA/48.13/3; MMeV/Recife_PE.BRA/48.13/4; MMeV/Recife_PE.BRA/49.13/3; MMeV/Recife_PE.BRA/49.13/5; MMeV/Recife_PE.BRA/50.13; MMeV/Recife_PE.BRA/50.13/3; MMeV/Recife_PE.BRA/50.13/4; MMeV/Recife_PE.BRA/51.13; MMeV/Recife_PE.BRA/3.14/10; MMeV/Recife_PE.BRA/4.14/12; MMeV/Recife_PE.BRA/8.14/3
6	6Seq_MMeV/Forquilha_CE.BRA/31.14/2_a_36.14	MMeV/Forquilha_CE.BRA/32.14; MMeV/Forquilha_CE.BRA/32.14/2; MMeV/Forquilha_CE.BRA/33.14; MMeV/Forquilha_CE.BRA/35.14; MMeV/Forquilha_CE.BRA/31.14/2; MMeV/Forquilha_CE.BRA/36.14
9	9Seq_MMeV/VitoriaDeSantoAntao_PE.BRA/16.13/5_a_24.13	MMeV/VitoriaDeSantoAntao_PE.BRA/24.13/2; MMeV/VitoriaDeSantoAntao_PE.BRA/22.13; MMeV/VitoriaDeSantoAntao_PE.BRA/20.13/6; MMeV/VitoriaDeSantoAntao_PE.BRA/20.13/3; MMeV/VitoriaDeSantoAntao_PE.BRA/19.13/6; MMeV/VitoriaDeSantoAntao_PE.BRA/19.13; MMeV/VitoriaDeSantoAntao_PE.BRA/18.13; MMeV/VitoriaDeSantoAntao_PE.BRA/17.13; MMeV/VitoriaDeSantoAntao_PE.BRA/16.13/5

2	2Seq_MMeV/Caruaru_PE.BRA/38.13/2_7.14/3	MMeV/Caruaru_PE.BRA/38.13/2; MMeV/Caruaru_PE.BRA/7.14/3
9	7Seq_MMeV/JoaoPessoa_PB.BRA/21.13_a_24.13	MMeV/JoaoPessoa_PB.BRA/22.13/6; MMeV/JoaoPessoa_PB.BRA/24.13/3; MMeV/JoaoPessoa_PB.BRA/22.13/5; MMeV/JoaoPessoa_PB.BRA/22.13/4; MMeV/JoaoPessoa_PB.BRA/22.13/3; MMeV/JoaoPessoa_PB.BRA/21.13/2; MMeV/JoaoPessoa_PB.BRA/21.13
	2Seq_JaboataoDosGuararapes_PE.BRA/18.13_19.13	JaboataoDosGuararapes_PE.BRA/19.13/10; MMeV/JaboataoDosGuararapes_PE.BRA/18.13
24	4Seq_MMeV/Uruburetama_CE.BRA/5.14_a_14.14	MMeV/Uruburetama_CE.BRA/5.14/10; MMeV/Uruburetama_CE.BRA/8.14/2; MMeV/Uruburetama_CE.BRA/8.14; MMeV/Uruburetama_CE.BRA/14.14
	5Seq_MMeV/Massape_CE.BRA/28.14_a_36.14	MMeV/Massape_CE.BRA/33.14/2; MMeV/Massape_CE.BRA/36.14; MMeV/Massape_CE.BRA/29.14/3; MMeV/Massape_CE.BRA/29.14/2; MMeV/Massape_CE.BRA/29.14; MMeV/Massape_CE.BRA/28.14
	5Seq_MMeV/SaoPaulo_SP.BRA/5.14_a_7.14	MMeV/SaoPaulo_SP.BRA/7.14; MMeV/SaoPaulo_SP.BRA/6.14/2; MMeV/SaoPaulo_SP.BRA/6.14; MMeV/SaoPaulo_SP.BRA/5.14/7; MMeV/SaoPaulo_SP.BRA/5.14/3
	5Seq_MMeV/Paulista_PE.BRA/16.13_21.13	MMeV/Paulista_PE.BRA/21.13; MMeV/Paulista_PE.BRA/19.13/5; MMeV/Paulista_PE.BRA/18.13/8; MMeV/Paulista_PE.BRA/16.13/3; MMeV/Paulista_PE.BRA/16.13
	5Seq_MMeV/Olinda_PE.BRA/12.13/2_a_26.13	MMeV/Olinda_PE.BRA/26.13/4; MMeV/Olinda_PE.BRA/25.13; MMeV/Olinda_PE.BRA/15.13; MMeV/Olinda_PE.BRA/13.13; MMeV/Olinda_PE.BRA/12.13/2
85	78Seq_MMeV/Fortaleza_CE.BRA/52.13_a_19.15	MMeV/Fortaleza_CE.BRA/52.13; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/03.14/4; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/1.14; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/1.14/3; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/19.14; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/2.14; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/2.14/2; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/2.14/3; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/2.14/4; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/2.14/5; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/2.14/6; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/3.14; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/3.14/2; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/3.14/3; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/3.14/4; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/3.14/5; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/3.14/7; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/3.14/8; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/3.14/9; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/4.14; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/4.14/11; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/4.14/2; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/4.14/3; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/4.14/4; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/4.14/5; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/4.14/6; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/4.14/7; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/4.14/8; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/41.14; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/42.14; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/46.14/2; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/48.14/2; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/48.14/4; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/49.14; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/49.14/2; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/49.14/3; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/49.14/5; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/5.14; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/5.14/2; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/5.14/4; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/5.14/5; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/5.14/6; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/50.14/2; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/50.14/3; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/50.14/4; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/50.14/5; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/51.14; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/51.14/2; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/51.14/4; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/51.14/5; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/52.14; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/52.14/2; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/52.14/3; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/52.14/5; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/53.14; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/53.14/2; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/53.14/3; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/7.14/2; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/1.15/3; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/1.15/4; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/2.15; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/2.15/2; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/3.15; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/4.15; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/4.15/2; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/4.15/3; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/5.15; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/5.15/2; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/6.15; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/7.15; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/10.15; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/10.15/2; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/11.15; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/12.15; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/14.15; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/14.15/2; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/16.15; MMeV/Fortaleza_CE.BRA/19.15
	7Seq_MMeV/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/12.13_23.13	MMeV/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/23.13/3; MMeV/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/23.13 MMeV/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/22.13/2; MMeV/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/21.13/4; MMeV/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/15.13/2; MMeV/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/14.13; MMeV/CaboDeSantoAgostinho_PE.BRA/12.13

## 10.4 RESUMO ENVIADO E ACEITO AO SIMPÓSIO DR HERMANN SCHATZMAYR 2017

### THE ROLE OF CHARACTERISING MEASLES IN THE BRAZILIAN SURVEILLANCE PROGRAMME: A MOLECULAR EVALUATION OF RECENT OUTBREAKS FROM 2013-2015

Suelen Soares da Silva<sup>1,2</sup>, Xênia Romeu Lemos<sup>1</sup>, Jalusy de Almeida Bezerra<sup>1</sup>, Paola Cristina Resende<sup>1</sup>, Helene Shultz<sup>3</sup>, Alberto Severini<sup>3</sup>, David Brown<sup>1</sup>, Marilda Siqueira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – Laboratório de Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup> – Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical, IOC/FIOCRUZ.

<sup>3</sup> – Viral Exanthemata and STD Section, National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canadá, Winnipeg, Manitoba, Canadá

E-mail: [suelenss@ioc.fiocruz.br](mailto:suelenss@ioc.fiocruz.br)

Measles virus (MeV) belongs to *Paramyxoviridae* family, its genome is composed of SS RNA. It is classified into 24 genotypes based on nucleoprotein (N) gene. MeV is a single serotype, it is highly contagious and since 1960s, a vaccine has been available. In 2016, the Americas region achieved MeV elimination, although MeV continues to circulate worldwide and the risk of imported cases remains.

In Brazil, imported cases and small outbreaks have occurred since 2000. However, in 2013 a large outbreak started in northeast Brazil and circulation of virus continued until 2015. The aim of this study is to characterize the sequence of the MeV strains detected from 2013 to 2015, to compare with epidemiological data and to describe the origin and spread of outbreak in the Northeast region. To conduct this study we sequenced the N gene to genotype the strains and the hypervariable region (MF-UTR) to classify lineages inside the genotypes. Phylogenetic and evolutionary reconstruction were conducted with the genetic data obtained and compared to epidemiological data.

The genetic characterization identified three genotypes B3, D4 and D8 in Brazil during 2013 to 2015. Strains B3 and D4 were found as isolated imported cases, however the D8 genotype was introduced in southeast and northeast regions in 2013 and spread in the northeast States of Pernambuco and Ceara. Using MF-UTR Bayesian analyses, it was possible to observe that at least two lineages were introduced during the D8 outbreak in northeast Brazilian region. However, further analyses are being conducted to understand better the spread of D8 outbreak.

This study reinforce the value of molecular and epidemiological surveillance of MeV and highlight the importance of sequencing the MF-UTR region to elucidate the evolutionary dynamics of genotypes during the course of an outbreak.

## 10.5 RESUMO ENVIADO, ACEITO E SELECIONADO PARA APRESENTAÇÃO ORAL PELO CONGRESSO DE VIROLOGIA 2017

### MEASLES IN THE ERA OF ELIMINATION: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF LINEAGES FROM 2013-2015 BRAZILIAN OUTBREAKS

Suelen Soares da Silva<sup>1,2</sup>, Xênia Romeu Lemos<sup>1</sup>, Jalusy de Almeida Bezerra<sup>1</sup>, Paola Cristina Resende<sup>1</sup>, Helene Shultz<sup>3</sup>, Alberto Severini<sup>3</sup>, David Brown<sup>1</sup>, Marilda Siqueira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – Laboratório de Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup> – Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical, IOC/FIOCRUZ.

<sup>3</sup> – Viral Exanthemata and STD Section, National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canadá, Winnipeg, Manitoba, Canadá

E-mail: [suelenss@ioc.fiocruz.br](mailto:suelenss@ioc.fiocruz.br)

Measles virus (MeV) belongs to *Paramyxoviridae* family, its genome is composed of SS RNA. It is classified into 24 genotypes based on nucleoprotein (N) gene. MeV is a single serotype, it is highly contagious and since 1960s, a vaccine has been available. In 2016, the Americas region achieved MeV elimination, although MeV continues to circulate worldwide and the risk of imported cases remains.

In Brazil, imported cases and small outbreaks have occurred since 2000. However, in 2013 a large outbreak started in northeast Brazil and circulation of virus continued until 2015. The aim of this study is to characterize the sequence of the MeV strains detected from 2013 to 2015, to compare with epidemiological data and to describe the origin and spread of outbreak in the Northeast region. To conduct this study we sequenced the N gene to genotype the strains and the hypervariable region (MF-UTR) to classify lineages inside the genotypes. Phylogenetic and evolutionary reconstruction were conducted with the genetic data obtained and compared to epidemiological data.

The genetic characterization identified three genotypes B3, D4 and D8 in Brazil during 2013 to 2015. Strains B3 and D4 were found as isolated imported cases, however the D8 genotype was introduced in southeast and northeast regions in 2013 and spread in the northeast States of Pernambuco and Ceara. Using MF-UTR Bayesian analyses, it was possible to observe that at least two lineages were introduced during the D8 outbreak in northeast Brazilian region. However, further analyses are being conducted to understand better the spread of D8 outbreak.

This study reinforce the value of molecular and epidemiological surveillance of MeV and highlight the importance of sequencing the MF-UTR region to elucidate the evolutionary dynamics of genotypes during the course of an outbreak.

**10.6 TABELA FORNECIDA PELA SIEMENS/DADE BEHRING, ENZYGNOST®  
ANTI-MEASLES VIRUS/IgG**

**ALPHA EVALUATION OF VIROLOG. ENZYGNOST IgG TESTS**

<b>TEST :</b>	<b>Anti-Measles/IgG</b>	<b>LOT.:</b>	
<b>Nominal Value :</b>		<b>Test</b>	<b>Failed</b> *
<b>Upper Margin</b>		Choose a different test	
<b>Lower Margin</b>			
<b>Alpha</b>			
<b>Beta</b>			

	OD Ag	OD CoAg	Ag - CoAg	Mean value
<b>OD. Ref 1</b>			0,000	
<b>OD. Ref 2</b>			0,000	0,000

**Correction factor :** #DIV/0!

Sample ID	OD Ag	OD CoAg	Corrected OD	Result mIU/ml	Qualitative Result
1			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
2			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
3			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
4			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
5			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
6			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
7			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
8			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
9			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
10			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
11			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
12			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
13			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
14			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
15			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
16			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
17			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
18			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
19			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
20			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
21			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
22			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
23			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
24			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
25			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
26			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
27			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
28			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
29			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
30			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
31			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
32			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
33			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
34			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
35			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
36			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
37			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
38			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
39			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
40			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
41			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
42			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
43			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
44			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
45			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
46			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
47			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!
48			#DIV/0!	## #DIV/0!	#DIV/0!

\* If the test fails, the results should not be released.  
If samples have been diluted 1:2310 all results have to be multiplied by factor 10

**Cut off : 0.1 ΔΔ**  
**Retest range : >=0.1 ΔΔ - <=0.2 ΔΔ**

User :

Sheet No.:

DADE BEHRING