

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**ELIANE VEIGA DA COSTA**

**PERFIL GENÔMICO DOS POLIOVÍRUS DE ORIGEM VACINAL ISOLADOS DE  
CASOS DE PARALISIAS FLÁCIDAS AGUDAS, NO BRASIL, NO PERÍODO PÓS-  
ELIMINAÇÃO DOS POLIOVÍRUS SELVAGENS DA REGIÃO DAS AMÉRICAS.**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte  
dos requisitos para obtenção do título de Doutor em  
Ciências

**Orientador:** Prof. Dr. Edson Elias da Silva

**RIO DE JANEIRO**

2011

## Verso da folha inicial

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C837

Costa, Eliane Veiga da.

Perfil genômico dos poliovírus de origem vacinal isolados de casos de paralisias flácidas agudas, no Brasil, no período pós-eliminação dos poliovírus selvagens da região das Américas. / Eliane Veiga da Costa. – Rio de Janeiro, 2011.

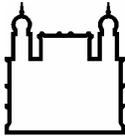
xvii, 103 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011.

Bibliografia: f. 94-103

1. Poliovírus. 2. Poliovírus derivado da vacina. 3. Mutações. 4. Recombinação. I. Título.

CDD 579.2572



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**ELIANE VEIGA DA COSTA**

**PERFIL GENÔMICO DOS POLIOVÍRUS DE ORIGEM VACINAL ISOLADOS DE CASOS DE PARALISIAS FLÁCIDAS AGUDAS, NO BRASIL, NO PERÍODO PÓS-ELIMINAÇÃO DOS POLIOVÍRUS SELVAGENS DA REGIÃO DAS AMÉRICAS.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Elias da Silva**

**Aprovada em: 28/04/2011**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Elba Regina Lemos - Presidente e Revisora**

**Prof. Dra. Marize Miagostovich**

**Prof. Dra. Alda Maria Cruz**

**Prof. Dr. Elizeu Waldman**

**Prof. Dra. Ana Maria Gaspar**

Rio de Janeiro, 28 de abril de 2011.

Aos meus amados pais, Helcio e Jane, por todo amor, apoio, amparo, carinho, orientação e pelo grande exemplo de conduta, respeito e dignidade que recebi por toda minha vida.

Aos meus queridos e amados filhos Rodrigo, Alexandre e Henrique por tudo que são, pelo que me ensinam e por terem dado o verdadeiro sentido à minha vida.

Ao amadíssimo Leozinho que com sua chegada trouxe um sentimento tão especial e ainda não conhecido por mim: a felicidade de ser avó.

A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento. Platão

A única coisa que devemos temer é o próprio medo.  
Franklin Roosevelt (*acometido por poliomielite parálitica aos 39 anos*)

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador Dr. Edson Elias da Silva que me inseriu na virologia e que com seu “amor” pelos vírus fez com que me apaixonasse por “eles”. Agradeço também por ter confiando a mim o diagnóstico das paralisias flácidas agudas e meningites virais, o que permitiu que me aproximasse dos poliovírus que hoje ocupam grande parte da minha vida profissional. Seu apoio principalmente na parte final deste trabalho foi de grande importante.

Ao programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular e toda sua equipe, em particular a Daniele Lobato por sua ajuda nas soluções das dificuldades surgidas nesses quatro anos.

A Dra. Elba Lemos por ter aceitado ser a revisora deste trabalho, mesmo sem espaço em sua agenda, contribuindo com toda sua experiência.

A atual equipe do Laboratório de Enterovírus (LEV) que participou com apoio e “socorros” para que fosse possível a finalização deste trabalho: Gina, Cátia, Márcia, Elaine, Cristiane, Emmanuele, Silas, Isadora e Tatiana.

Aos profissionais que pertenceram à equipe do LEV: Michele, Marcela, Liliane, Rafael, Alex, Dolcy, Julia, Joseane, Lenise, Fernanda Leve, Gustavo, Carla, Monica, Karina, Paula(s), Fernando Conte, Vivian, Denise, Graça, Juliana(s), Ana Paula, Renata, Edmilson e Júnior. Em particular agradeço aos que participaram na etapa molecular da tese: Rafaela, Viviani, Sérgio Monteiro, e nos bancos de dados: Aline Silva.

Aos profissionais que passaram pelo LEV e deixaram um lugar especial no meu coração Luciana Nascimento, Rosane Nunes, Michele Murta, Alexandre Marcelino, Ana Carolina, Érika Klann, Márcia Paschoal, Aline Muzy, Maria Helena Galdino, Sabrina e Dayse Caldas.

Aos funcionários de apoio ao LEV: Luis, Robson e Waldir pelo suporte as atividades e adaptações ao Sistema da Qualidade, junto ao laboratório.

A amiga Heliana Santos que durante todos estes anos apoiou ao LEV com sua eficiência e a sua equipe.

Aos companheiros do Pavilhão Helio e Peggy Pereira que de alguma forma contribuíram para tornar a convivência e o trabalho melhor.

A COVER, nas profissionais e amigas Alessandra Vianna Cardoso e Zirlei de Matos.

Aos laboratórios regionais que integram a rede do sistema nacional de vigilância da poliomielite, Instituto Evandro Chagas (IEC- Pará) e Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN-PE), pelo envio de parte das amostras de poliovírus isolados.

A Dra Viviana Malirat por seu incentivo ao meu ingresso no doutorado e por sua amizade.

Aos meus queridos amigos e parentes de SP em particular, Claudia, tia Heide, Solange, Hermes, Patrícia e Clóvis, por todo o carinho e torcida.

As famílias fraternas Cruz (Aloísio, Icléia, Ana Beatriz, Adriana, Gabriele, Gisele) e Cunha dos Santos (César, Anarlete, Filipe, Verônica e Gariela) que de diferentes maneiras estiveram presentes em minha vida com amizade e carinho.

Aos amigos do GEAL que com amizade e carinho estiveram presentes nos últimos oito anos em particular a Maria de Jesus, Nilzete, Nilce, Ronald, Robledo, Miriam, Terezinha, Leila, Carlos, Shirlei, Inês, Michel, Débora, Acácio, Sérgio, Roberto, José Ricardo, Ana Luz e Maria Luiza pela compreensão nos momentos mais críticos.

As amigas “de sempre” que de perto ou longe estiveram sempre presentes em diferentes momentos de minha vida: Cláudia Ramalho, Gláucia Pinheiro, Leila Ribeiro, Liliana Spano, Sinéa Mendes, Tânia Villas Boas, Vânia Veiga, Virgínia Caetano e Vera Callado.

Aos profissionais que tiveram grande importância na minha saúde física e mental: Luis Mário Duarte, Mônica Lima, Nina Goes, Regina Côrtes, Roberto Duque e Silvia Bretz.

A Fernanda Burlandy por sua amizade e por toda sua ajuda junto ao diagnóstico das PFAs/Meningites Virais, e junto à gestão da Qualidade permitindo com que me afastasse na fase final deste trabalho.

A Rachel Fontella por sua amizade demonstrada por vários anos e pela ajuda técnica na análise das sequências propondo a rede de haplótipos e sugestões em filogenética.

Ao Fernando Tavares por toda a ajuda no sequenciamento das amostras, apoio nas compras do LEV e principalmente por sua amizade.

A Renata Campos, que com sua amizade me ajudou a superar tantos momentos difíceis e grandes dificuldades. No aspecto profissional participou com sugestões e incentivo que me ajudaram na fase de finalização deste trabalho.

Aos queridos amigos Dr. André Luiz, Sheilla, José Grosso, Itanajé e Garcez que silenciosamente estiveram presentes com carinho, apoio e principalmente suporte em momentos de maior dificuldade.

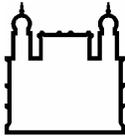
Ao Edson, meu companheiro de vida por mais de 20 anos em que juntos pudemos vencer grande desafios me deixando mais forte como pessoa. Hoje ainda compartilhamos de outra maneira, pois desta caminhada permaneceram o Alexandre e o Henrique que juntamente com o Rodrigo, são capazes de iluminar cada dia de minha vida.

As minhas queridas “filhinhas” Janaína, Rafaela e Renata por todo o carinho, incentivo, apoio e amizade. Um agradecimento especial a vocês por existirem nas vidas de meus filhos trazendo mais alegria a todos.

Aos meus queridos irmãos Helcio e Rogerio, “irmãs” Sheyla e Renata e sobrinhos Daniel e André que completam a alegria de nossa família.

Ao meu amado Leozinho que com sua simpatia, alegria e seu sorriso especial fizeram com que a vovó tivesse forças para prosseguir.

A Deus pela oportunidade de superação, pelo apoio de tantas pessoas para esta superação e pela eterna orientação, proteção e amor de Pai.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

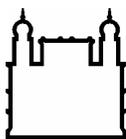
### **Perfil genômico dos poliovírus de origem vacinal isolados de casos de Paralisias Flácidas Agudas, no Brasil, no período pós-eliminação dos poliovírus selvagens da Região das Américas.**

#### **RESUMO**

#### **TESE DE DOUTORADO**

**ELIANE VEIGA DA COSTA**

A poliomielite (poliomielite anterior aguda, paralisia infantil) é uma doença infecciosa de caráter agudo que ocorre seguida a uma infecção causada por um dos três sorotipos de poliovírus, denominados poliovírus tipos 1, 2 e 3. Em 1988, quando os poliovírus selvagens eram endêmicos em 125 países ficou estabelecida durante a 41<sup>a</sup> Assembléia Mundial da Saúde, em Genebra, a meta da erradicação da poliomielite até o ano 2000. Os poliovírus selvagens estão hoje restritos a apenas quatro países (Nigéria, Afeganistão, Paquistão e Índia). Este grande sucesso é atribuído à utilização sistemática da vacina oral contra a poliomielite (VOP), desenvolvida pelo Dr. Albert Sabin. Esta vacina, licenciada nos anos de 1960s, e que vem sendo utilizada por mais de quatro décadas, consiste de variantes atenuadas de cada um dos três sorotipos de poliovírus. Por ser uma vacina constituída por vírus vivos atenuados, os problemas a ela associados estão principalmente ligados à sua instabilidade genética e a possibilidade do aparecimento de mutações e recombinações nas subpopulações virais excretadas. Durante a replicação do vírus vacinal em humanos, frequentemente ocorre reversão de algumas substituições nucleotídicas que conferem o fenótipo atenuado. Essa é a principal causa do aparecimento de raros casos de poliomielite associados à vacina (VAPP), relatados em diferentes países, assim como surtos de poliomielite paralítica devidos à infecção por estes vírus vacinais derivados (PVDV) que possuem propriedades biológicas semelhantes aos poliovírus selvagens. A análise e caracterização de quatro regiões distintas do genoma viral (5'NC, VP1, 2C e 3D), dos poliovírus vacinais isolados no Laboratório de Enterovírus do Instituto Oswaldo Cruz, a partir de amostras clínicas de casos de paralisia flácida aguda que ocorreram no Brasil, no período de 1995 a 2007, constituíram no principal objetivo do presente trabalho. Um total de 177 amostras dos três sorotipos foi analisado por sequenciamento nucleotídico em todo o gene que codifica a VP1; 222 amostras foram analisadas por duplex RT-PCR nas regiões 2C e 3D; 68 amostras foram analisadas na região 5'NC e 44 amostras foram analisadas nas 4 regiões (5'NC, VP1, 2C e 3D). Dois isolados de PV2, apresentando mais de 1% de mutação em VP1, foram identificados e classificados como PVDV2. Existem aproximadamente 40 relatos de PVDV relacionados a pacientes imunodeficientes de 1962 a 2010, globalmente distribuídos, porém nenhum identificado no Brasil. Das 68 amostras sequenciadas na região 5'NC visando à avaliação de uma importante posição nucleotídica envolvida na atenuação da neurovirulência em cada um dos 3 sorotipos (PV1<sub>480</sub>, PV2<sub>481</sub> e PV3<sub>472</sub>), os seguintes resultados foram encontrados: PV1=18.5% mutadas na posição 480, PV2=65% mutadas em 481 e PV3=81% mutadas em 472. Recombinação (em 2C/3D) foi encontrada em 15 amostras: 1 PV1 (1,3%), 5 PV2 (6,6%) e 9 PV3 (13,2%). Os três sorotipos de poliovírus apresentaram comportamento distinto em relação às análises realizadas, sendo o sorotipo 3 o menos estável em relação ao padrão de recombinação e reversão à neurovirulência seguido pelo sorotipo 2 e o sorotipo 1 foi o mais estável. A monitorização do perfil genômico dos poliovírus vacinais em circulação é essencial no estágio final de erradicação global da poliomielite.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Genomic profile of Sabin vaccine-related polioviruses associated with Acute Flaccid Paralysis, from Brazil in the period post-elimination of wild polioviruses in the Americas

### **ABSTRACT**

#### **TESE DE DOUTORADO**

**ELIANE VEIGA DA COSTA**

Poliomyelitis (acute anterior poliomyelitis, infantile paralysis) is an acute infectious disease which occurs subsequent to an infection caused by any of the three serotypes of polioviruses, designated poliovirus types 1, 2 and 3. In 1988, when wild polioviruses were endemic in 125 countries, the 41st World Health Assembly in Geneva set a goal for poliomyelitis eradication by the year 2000. Nowadays, poliomyelitis in its endemic form is restricted to only four countries: Nigeria, Afghanistan, Pakistan, and India. This remarkable success is attributed to the systematic use of oral poliomyelitis vaccine (OPV), developed by Dr. Albert Sabin. This vaccine, which was licensed in the 1960's and is in use for over four decades, consists of attenuated variants of each of the three poliovirus serotypes. Because OPV consists of live attenuated viruses, the problems associated with this vaccine are mainly related to its genetic instability, which favor the emergence of mutations and recombinations among the excreted viral sub-populations. Also, during the process of virus replication in humans, some nucleotide substitutions responsible for the attenuated phenotype are often reverted. That is the main cause of the appearance of rare cases of vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP) reported in several countries as well as paralytic poliomyelitis outbreaks caused by vaccine-derived polioviruses which exhibit biological properties similar to wild polioviruses. The genomic characterization in four distinct regions of the genome (5'NC, VP1, 2C, and 3D) of vaccine-related polioviruses isolated in our laboratory from clinical samples of acute flaccid paralysis cases which occurred in Brazil, from 1995 to 2007 was the main purpose of the present work. A total of 177 isolates of the three serotypes of polioviruses were analyzed by nucleotide sequencing on the entire gene that codifies VP1; 222 isolates were analyzed by duplex PCR in 2C and 3D regions; 68 isolates were analyzed at the 5'-NCR while 44 isolates were analyzed in the four regions (5'-NCR, VP1, 2C and 3D). Two PV2 isolates presenting over 1% of mutations in VP1 were identified and classified as VDPV2. There are approximately 40 reports of VDPV related to immunodeficient patients around the world from 1962 to 2010, but none of those occurred in Brazil. From the 68 isolates which were analyzed on the 5'NC region, in order to evaluate an important nucleotide position involved in attenuation of neurovirulence in each of the 3 serotypes (PV1<sub>480</sub>, PV2<sub>481</sub> e PV3<sub>472</sub>). The following results were found: PV1 = 18.5% mutated at position 480, PV2 = 65% mutated at position 481 and PV3 = 81% mutated at 472. Recombination was found in 15 isolates: 1 PV1 (1.3%), 5 PV2 (6.6%) e 9 PV3 (13.2%). The three serotypes of polioviruses behavior distinctly to the analyses: type 3 showed to be the the least stable regarding the recombination and neurovirulence reversion patterns followed by serotype 2 while serotype 1 was the most stable. The knowledge regarding the genomic pattern of circulating polioviruses is essential at the final stages of poliomyelitis eradication.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1.1	Número de casos confirmados de Poliomielite no Brasil de 1975 a 1992.	5
1.2	Número de casos confirmados de Poliomielite e notificados de paralisia flácida aguda. Brasil, 1979 a 2008.	6
1.3	Fluxograma de coleta de amostras de fezes para pesquisa de enterovírus	9
1.4	Estrutura genômica dos Enterovirus	13
1.5	Ciclo de replicação dos picornavírus	16
1.6	Distribuição geográfica dos tipos de vacina contra a poliomielite utilizadas de 2000 a 2008	28
1.7	Distribuição geográfica dos tipos de vacina contra a poliomielite utilizadas após 2008	29
1.8	Rede laboratorial da OMS para a poliomielite	32
1.9	Distribuição geográfica global dos excretores crônicos de poliovírus (i-PVDV)	35
1.10	Distribuição geográfica dos surtos de PVDV circulantes (c-PVDV)	37
1.11	Distribuição geográfica dos PVDV considerados ambíguos (a-PVDV)	38
3.1	Fluxograma das etapas do diagnóstico laboratorial para enterovirose	42
3.2	Diagrama das amostras de PV1, PV2 e PV3 em relação ao tipo de análise realizada nas diferentes regiões do genoma.	43
4.1	Distribuição das 177 amostras de poliovírus analisadas por região geográfica do Brasil no período de 1995 a 2007 para a região VP1.	52
4.2	Distribuição das amostras de poliovírus vacinais separadas por sorotipo e analisadas na região de VP1 em relação às regiões do Brasil de 1995 a 2007.	53
4.3	Distribuição do número de mutações na região de VP1 para cada um dos sorotipos de poliovírus	54

<b>4.4</b>	Distribuição do número de mutações sinônimas e não sinônimas	<b>55</b>
<b>4.5</b>	Árvore filogenética construída pelo algoritmo Neighbor-Joining para as 70 amostras analisadas dos poliovírus sorotipo 1.	<b>57</b>
<b>4.6</b>	Rede de haplótipos dos isolados de poliovírus sorotipo 1.	<b>59</b>
<b>4.7</b>	Representação gráfica da rede de haplótipos do poliovírus sorotipo 1.	<b>60</b>
<b>4.8</b>	Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor-Joining para as 53 amostras de poliovírus sorotipo 2.	<b>62</b>
<b>4.9</b>	Rede de haplótipos dos isolados de poliovírus sorotipo 2.	<b>64</b>
<b>4.10</b>	Representação gráfica da rede de haplótipos do poliovírus sorotipo 2	<b>65</b>
<b>4.11</b>	Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor-Joining para as 54 amostras de poliovírus sorotipo 3.	<b>67</b>
<b>4.12</b>	Rede de haplótipos dos isolados de poliovírus sorotipo 3.	<b>69</b>
<b>4.13</b>	Representação gráfica da rede de haplótipos do poliovírus sorotipo 3	<b>70</b>
<b>4.14</b>	Análise da região 5'NC de poliovírus tipo 1, 2 e 3 em relação ao principal nucleotídeo envolvido na atenuação de cada um dos sorotípos	<b>72</b>
<b>4.15</b>	Distribuição das amostras de poliovírus analisadas para recombinação em 2C e 3D por região geográfica do Brasil no período de 1995 a 2007.	<b>73</b>
<b>4.16</b>	Análise das amostras de PV1, PV2 e PV3 nas regiões de 2C e 3D	<b>74</b>
<b>4.17</b>	Perfil eletroforético de amostras analisadas em relação a padrão de recombinação nas regiões 2C e 3D.	<b>76</b>
<b>4.18</b>	Padrão de recombinação dos poliovírus vacinais isolados de casos de PFA	<b>78</b>

## LISTA DE TABELAS/QUADROS

<b>Tabela/ Quadros</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1.1</b>	Classificação dos enterovírus humanos baseada em seu relacionamento filogenético.	<b>11</b>
<b>1.2</b>	Comparação entre as principais características da Vacina Oral contra a Poliomielite e a Vacina Inativada contra a Poliomielite.	<b>23</b>
<b>1.3</b>	Eventos adversos pós-vacinação com VOP	<b>25</b>
<b>3.1</b>	Oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR, PCR e de sequenciamento nucleotídico.	<b>51</b>
<b>4.1</b>	Amostras analisadas nas regiões 5'NC, VP1, 2C e 3D do genoma de poliovírus tipo1	<b>81</b>
<b>4.2</b>	Amostras analisadas nas regiões 5'NC, VP1, 2C e 3D do genoma de poliovírus tipo2.	<b>82</b>
<b>4.3</b>	Amostras analisadas nas regiões 5'NC, VP1, 2C e 3D do genoma de poliovírus tipo3	<b>83</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

μL	.....microlitro
2Apro	.....Região 2A protease no genoma dos enterovírus
2C	.....Região da polimerase no genoma dos enterovírus
3' NC	.....Região 3' Não Codificante no genoma dos enterovírus
3D	.....Região da polimerase no genoma dos enterovírus
5' NC	.....Região 5' Não Codificante no genoma dos enterovírus
aa	.....Aminoácido
A	.....Adenina
aPVDV	.....Poliovírus derivado vacinal ambíguo
BGM	..... <i>Green monkey cells B</i> (linhagem celular de macaco africano)
b-VOP	.....Vacina Oral contra a poliomielite bivalente
C	.....Citosina
CD155	.....Receptor específico para o poliovírus
CID	.....Código Internacional de Doenças
cDNA	.....DNA complementar
COVER	.....Coordenação de Vigilância de Doenças de Transmissão Respiratória e Imunopreveníveis
cPVDV	.....Poliovírus derivado vacinal circulante
cPVDV1	.....Poliovírus derivado vacinal circulante tipo 1
cPVDV2	.....Poliovírus derivado vacinal circulante tipo 2
cPVDV3	.....Poliovírus derivado vacinal circulante tipo 3
ddNTP	.....Didesoxiribonucleotídeos
DNA	.....Ácido desoxirribonucleico
dNTP	.....Desoxirribonucleotídeos
DPT	.....Vacina tríplice contra difteria, tétano e coqueluche
DTaP-HepB-IPV	.....Vacina pentavalente contra difteria, tétano, coqueluche acelular, hepatite B e poliomielite inativada
DTaP-IPV	.....Vacina tetravalente contra difteria, tétano, coqueluche acelular, hepatite B e poliomielite inativada
DTaP-IPV/Hib	.....Vacina pentavalente contra difteria, tétano, coqueluche acelular, poliomielite inativada e <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
DT-IPV	.....Vacina contra a difteria, tétano e poliomielite inativada
DTP-Hib-HepB-IPV	.....Vacina hexavalente contra difteria, tétano, coqueluche, <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b, hepatite B e poliomielite inativada
DTP-IPV	.....Vacina contra a difteria, tétano, coqueluche e poliomielite inativada
ECP	.....Efeito citopático
EVNP	.....Enterovírus Não pólio
FDA	..... <i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Drogas e Alimentos)
FMDV	..... <i>Foot and mouth disease virus</i> (Vírus da febre aftosa)
G	.....Guanina
GPEI	..... <i>Global Polio Eradication Initiative</i> (Iniciativa Global para a Erradicação Global da Poliomielite)
HCl	.....Ácido Clorídrico
HCV	.....Vírus da Hepatite C

HeLa	.....Linhagem de células de cervix (humana)
HEp-2C	.....Linhagem de células de origem de câncer de laringe -Cincinnati
HEV-A	.....Espécie A dos Enterovírus Humanos
HEV-B	.....Espécie B dos Enterovírus Humanos
HEV-C	.....Espécie C dos Enterovírus Humanos
HEV-D	.....Espécie D dos Enterovírus Humanos
HIV	.....Vírus da Imunodeficiência Humana
hPVR	.....Receptor humano específico para o poliovírus
IEC	.....Instituto Evandro Chagas
IM	.....Intramuscular
IOC	.....Instituto Oswaldo Cruz
IPV	... <i>Inactivate Polio Vaccine</i> (Vacina inativada contra a poliomielite)
iPVDV	.....Poliovírus derivado vacinal de imunodeficiente
IRES	..... <i>Internal Ribosome entry site</i> (local da entrada do ribossoma)
KCl	.....Cloreto de potássio
kd	.....Quilodalton
L20B	.....Linhagem celular de origem murínica
LEV	.....Laboratório de Enterovírus
m-VOP	.....Vacina Oral contra a Poliomielite monovalente
MEF-1	.....Cepa de referência laboratorial de poliovírus selvagem tipo 2
MgCl <sub>2</sub>	.....Cloreto de magnésio
mL	.....mililitro
mM	.....milimolar
MS	.....Ministério da Saúde
N-Ags	..... Sítios antigênicos de neutralização
nt	.....nucleotídeo
° C	.....graus Celsius
OMS	.....Organização Mundial da Saúde
OPAS	.....Organização Panamericana da Saúde
OPV	..... <i>Oral Polio Vaccine</i> (Vacina Oral contra a Poliomielite)
ORF	..... <i>Open reading frame</i> (fase de leitura aberta)
PAHO	... <i>Panamerican Health Organization</i> (Organização Panamericana da Saúde)
PAI	.....Programa Ampliado de Imunizações
pb	.....Pares de bases
PCR	..... <i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia pela polimerase)
PFA	.....Paralisia Flácida Aguda
pH	.....potencial de Hidrogênio
PNI	.....Programa Nacional de Imunização
PV	.....Poliovírus
PVDV	.....Poliovírus derivado vacinal ou da vacina
PVDV2	.....Poliovírus derivado vacinal ou da vacina tipo 2
Primer	.....Oligonucleotídeo iniciador
Ptn	.....Proteína

RD	.....Linhagem celular com origem em um rabdomiossarcoma
RNA	.....Ácido Ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	.....Ácido Ribonucleico mensageiro
RNase	.....Ribonuclease
RT-PCR	.... <i>Retrotranscription-Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa)
S1	.....Sabin 1
S1-REC	...Oligonucleotídeos para avaliar recombinação do poliovírus tipo 1
S2	.....Sabin 2
S2-REC	...Oligonucleotídeos para avaliar recombinação do poliovírus tipo 2
S3	.....Sabin 3
S3-REC	...Oligonucleotídeos para avaliar recombinação do poliovírus tipo 3
SAGE	.... <i>Strategic Advisory Group of Experts (Grupo de especialistas para ações estratégicas)</i>
SC	.....Subcutâneo
SDS	.....Dodecil sulfato de sódio
SRE	.....Sistema do retículo endotelial
SINAN	.....Sistema Nacional de Agravos de Investigação
SNC	.....Sistema Nervoso Central
SNCD	.....Sistema de notificação compulsória de doenças
SPP	.....Síndrome pós-poliomielite
T	.....Timina
UNICEF	.... <i>The United Nations Children's Fund</i> (Fundo das Nações Unidas para a infância)
TAE	.....Tris-Acetato-EDTA
TBE	.....Tris-Borato-EDTA
TCID <sub>50</sub>	..... <i>Tissue Culture Infective Dose 50%</i> (50% da Dose infectante em cultura de células)
TE	.....Tampão de eluição
Tris	.....Hidroximetil-aminometano
t-VOP	.....Vacina Oral contra a Poliomielite trivalente
V	.....Volts
VAPP	.... <i>Vaccine-Associated paralytic poliomyelitis</i> (caso associado à VOP)
VIP	.....Vacina Inativada contra a Poliomielite
VOP	.....Vacina Oral contra a Poliomielite
VP0	.....Proteína estrutural imatura
VP1	.....Proteína estrutural 1
VP2	.....Proteína estrutural 2
VP3	.....Proteína estrutural 3
VP4	.....Proteína estrutural 4
VPg	.....Proteína viral G ligada à região 5'NC
WHA	..... <i>World Health Assembly</i> (Assembleia Mundial da Saúde)
WHO	..... <i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)
WI-38	.....Linhagem celular diplóide humana

## SUMÁRIO

	<b>Páginas</b>
<b>Dedicatória</b> .....	iii
<b>Epígrafe</b> .....	iv
<b>Agradecimentos</b> .....	v
<b>Resumo</b> .....	vii
<b>Abstract</b> .....	viii
<b>Lista de ilustrações</b> .....	ix
<b>Lista de tabelas/quadros</b> .....	xi
<b>Lista de abreviaturas e siglas</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1 A poliomielite</b> .....	1
<b>1.1.1 História</b> .....	1
<b>1.1.2 Poliomielite no Brasil</b> .....	3
<b>1.1.2.1 Vigilância Epidemiológica</b> .....	7
<b>1.2 Os Poliovírus</b> .....	9
<b>1.2.1 Classificação</b> .....	10
<b>1.2.2 Estrutura e organização do Genoma</b> .....	12
<b>1.2.3 Ciclo de Replicação</b> .....	14
<b>1.2.4 Patogenia</b> .....	16
<b>1.2.4.1 Síndrome pós-poliomielite</b> .....	19
<b>1.2.5 Resistência a agentes físicos e químicos</b> .....	19
<b>1.2.6 Estabilidade genômica dos poliovírus</b> .....	20
<b>1.3 Vacinas</b> .....	21
<b>1.3.1 Vacina VOP</b> .....	23
<b>1.3.1.1 Poliomielite associada à vacina (VAPP)</b> .....	24
<b>1.3.2 Vacina VIP</b> .....	26
<b>1.3.3 Distribuição Global das vacinas contra a poliomielite</b> .....	28
<b>1.4 Programa de Erradicação</b> .....	29
<b>1.4.1 Vigilância laboratorial</b> .....	31
<b>1.5 Poliovírus Derivado da Vacina</b> .....	34
<b>1.6 Importância</b> .....	38

<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Amostras.....</b>	<b>42</b>
<b>3.2</b>	<b>Cultivos Celulares.....</b>	<b>43</b>
<b>3.3</b>	<b>Isolamento Viral.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4</b>	<b>Identificação do vírus isolado por RT-PCR.....</b>	<b>44</b>
<b>3.5</b>	<b>Extração do RNA.....</b>	<b>44</b>
<b>3.6</b>	<b>Construção do c-DNA.....</b>	<b>45</b>
<b>3.7</b>	<b>Reações de RT-PCR .....</b>	<b>45</b>
<b>3.7.1</b>	Amplificação da região 5'NC do genoma dos poliovírus.	45
<b>3.7.2</b>	Amplificação do gene da proteína VP1 do genoma dos poliovírus.....	45
<b>3.7.3</b>	Amplificação das regiões 2C e 3D.....	46
<b>3.8</b>	<b>Purificação dos produtos de RT-PCR.....</b>	<b>47</b>
<b>3.9</b>	<b>Avaliação quantitativa dos produtos de PCR purificados.....</b>	<b>47</b>
<b>3.10</b>	<b>Sequenciamento dos produtos de RT-PCR.....</b>	<b>48</b>
<b>3.11</b>	<b>Purificação dos produtos de extensão.....</b>	<b>48</b>
<b>3.12</b>	<b>Sequências obtidas nas reações de cycle sequencing.....</b>	<b>49</b>
<b>3.12.1</b>	Edição das sequências.....	49
<b>3.12.2</b>	Construção das árvores filogenéticas.....	49
<b>3.12.3</b>	Rede de haplótipos.....	49
<b>3.13</b>	<b>Oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR, PCR e sequenciamento nucleotídico .....</b>	<b>50</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>Análise genômica dos poliovírus vacinais .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1.1</b>	Análise nucleotídica do gene VP1 nos três sorotipos de poliovírus.....	53
<b>4.1.1.1</b>	Análise de VP1 para poliovírus sorotipo 1 .....	56
<b>4.1.1.1.1</b>	Análise Filogenética (PV1).....	56
<b>4.1.1.1.2</b>	Rede de Haplótipos (PV1).....	58
<b>4.1.1.2</b>	Análise de VP1 para poliovírus sorotipo 2 .....	61
<b>4.1.1.2.1</b>	Análise Filogenética (PV2).....	61
<b>4.1.1.2.2</b>	Rede de Haplótipos (PV2).....	63
<b>4.1.1.3</b>	Análise de VP1 para poliovírus sorotipo 3 .....	66
<b>4.1.1.3.1</b>	Análise Filogenética (PV3).....	66

4.1.1.3.2	Rede de Haplótipos (PV3).....	68
4.1.2	Análise nucleotídica da região 5'NC do genoma do poliovírus.....	71
4.1.3	Análise das regiões 2C e 3D (recombinação).....	73
4.1.4	Avaliação conjunta das regiões genômicas 5'NC, VP1, 2C e 3D dos três sorotipos de poliovírus.....	79
5.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	84
6.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	92
7.	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	93
8.	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	94

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A poliomielite

### 1.1.1. História

A poliomielite (poliomielite anterior aguda, paralisia infantil) é uma doença infecciosa de caráter agudo que ocorre seguida a uma infecção causada por um dos três sorotipos de poliovírus. Embora existam evidências de que a poliomielite afligiu a humanidade desde a antiguidade, como observado em artefatos produzidos na 18<sup>o</sup> dinastia (1580 a 1350 a.C.) do antigo Egito, informações referentes a esta doença anteriores ao século XVIII são difíceis de serem encontradas. A primeira descrição clara em inglês é a narrativa biográfica de paralisia aguda resultando em deficiência motora sofrida por Sir Walter Scott em 1772, no segundo ano de sua vida, no livro “Memoirs of the life of Sir Walter Scott, Bart”, escrito por J.G. Lockhart em 1837, como citado por Modlin (1995). A primeira descrição médica é reportada na segunda edição de “Treatise on Disease of Children”, publicada em 1789 por Michael Underwood, um pediatra e obstetra londrino. Quando se referiu à doença, como “debilidade das extremidades inferiores”, Underwood, cuidadosamente descreveu a predileção por crianças entre um e cinco anos e o relacionamento de fraqueza nos membros inferiores na doença aguda. No entanto, Underwood não fez referência aos surtos da doença (Modlin 1995).

Descrições posteriores independentes foram feitas por Giovanni Monteggia em 1813 e por John Shaw, um cirurgião londrino, em 1823. Entretanto, a natureza patológica da debilidade dos membros inferiores não foi entendida naquela ocasião. O neurologista escocês Abercrombie foi o primeiro a especular, em 1828, ao dizer que a lesão localizada no segmento anterior da matéria cinzenta da medula espinhal. Esse postulado foi avançado em 1840 pelo ortopedista e fisioterapeuta alemão Jacob Von Heine. A monografia de Heine, que pode ter sido a primeira série de casos reportados de poliomielite, cuidadosamente descreve os quadros clínicos dessa doença aguda em crianças pequenas e promove o manejo clínico dos pacientes com deficiência motora através de exercícios e aparelhos ortopédicos (Da Silva et al 2005).

Durante a segunda metade do século XIX, o desenvolvimento obtido nos campos da microscopia, patologia e bacteriologia operou profundas mudanças nos conceitos das origens das doenças humanas que tinham ficado obscuras por séculos. O desenvolvimento de técnicas histológicas permitiu a Cornil, trabalhando em 1872 no laboratório de Jean-Marie

Charcot, demonstrando que a paralisia residual era acompanhada pela atrofia da coluna anterolateral da medula espinhal, confirmando, assim, o postulado de Abercrombie e Heine. Charcot, posteriormente, mostrou que a paralisia era acompanhada pela perda dos neurônios motores no corno anterior da medula e esse achado gerou o termo da patologia de “poliomielite” (em grego *polios* significa cinza e *mielos* medula) (Moore & Morens 1984; Modlin 1995).

Durante este período, vários casos foram reportados na Noruega, Suécia e França. O primeiro desses, de um total de doze casos em 1868, foi erradamente classificado como meningite espinhal. A Bergenholtz foi creditado a descrição de 13 casos de poliomielite que ocorreram no norte da Suécia no verão de 1881, embora o trabalho fosse liberado verbalmente e nunca publicado. Posteriormente, outro surto, ligeiramente maior, ocorreu próximo a Lyon, na França em 1885.

A escassez de conhecimento sobre a poliomielite teve fim em 1890 com um relato feito por Karl Oskar Medin no décimo Congresso Médico Internacional em Berlim. Medin, um proeminente pediatra sueco, professor de pediatria no Instituto Karolinska, estudou intensamente as características clínicas da poliomielite durante uma epidemia envolvendo 44 casos em Estocolmo, no verão de 1887. Medin reconheceu que a doença começava com uma fase sistêmica, que geralmente não conseguia progredir para as paralisias neurológicas e também desenvolveu uma classificação da doença que se tornou amplamente usada durante décadas seguintes (Moore & Morens 1984, Modlin 1995).

Vários surtos de pequeno porte ocorreram nos Estados Unidos no final dos anos 1800s e início dos anos 1900s em várias cidades como Filadélfia, West Felician, Boston e, com destaque, o ocorrido em Otter Creek, no estado de Vermont em 1894, onde houve 12 mortes dos 132 casos. Esses primeiros surtos anunciavam as epidemias cada vez maiores para século XX, incluindo uma epidemia por toda a Suécia, com mais de 1.000 casos em 1905, outra de 1.200 casos na cidade de Nova Iorque em 1907 e a disseminação da doença pela Europa e Estados Unidos. Uma epidemia ainda maior assolou Nova Iorque alguns anos depois, em 1916, levando o departamento de saúde desta cidade a tomar ações diferenciadas no combate de surtos. Medidas de saúde pública aplicadas normalmente no combate de epidemias não apresentavam resultado no controle da doença, como era esperado. Os primeiros casos surgiram em junho e em 1 mês já estavam confirmados mais de 700 casos com 170 mortes. Em meados de agosto o número de pessoas paralisadas chegava a 5.500 com 1.500 óbitos. As autoridades e a população encontravam-se desesperadas, pois, mesmo com todas as ações possíveis, a epidemia continuava a aumentar, assim como o número de vítimas. Somente em setembro, o número de casos teve um declínio chegando a um total de 9.000 pessoas

paralisadas e 2.400 mortes, em sua maioria de crianças menores de 10 anos. Posteriormente, com a descoberta do poliovírus e de sua patogenia, ficaram claros os motivos das medidas iniciais de controle não terem sido suficientes para deter a epidemia (Offit 2005). A seguir são apresentadas algumas conclusões que foram obtidas durante as grandes epidemias da poliomielite descritas acima:

- Tratava-se de uma doença contagiosa.
- A doença afetava crianças, adolescentes, adultos jovens e também lactantes.
- A doença ocorria principalmente em classes economicamente favorecidas e frequentemente em regiões com baixa densidade populacional.
- Frequentemente era possível identificar uma doença leve sem comprometimento do Sistema Nervoso Central (SNC).

Esse último fato foi de importância crucial para o entendimento da natureza contagiosa da poliomielite e permitiu a conclusão de que a doença ocorria na ausência de exposição ao caso paralítico (Modlin 1995).

### **1.1.2. A poliomielite no Brasil**

Embora seja referida a ocorrência de casos esporádicos de poliomielite no Brasil durante as últimas décadas do século XIX, a literatura indica que a doença passou a ser observada com mais frequência no início do século passado, no Rio de Janeiro (1909-1911) e em São Paulo (1918) (Schatzmayr et al. 2002).

Surtos de certa magnitude foram registrados apenas na década de 1930, como os de Porto Alegre (1935), Santos (1937), São Paulo (1939) e Rio de Janeiro (1939). Há registros na imprensa de notícias alarmantes que corriam de boca em boca até fora dos limites de Santos sobre um surto da terrível moléstia, o que as autoridades de saúde tentavam negar (Campos et al. 2003). Várias capitais brasileiras foram igualmente acometidas durante a década de 1940, podendo-se mencionar: Belém (1943), Florianópolis (1943-1947), Recife (1946) e Porto Alegre (1945) (Schatzmayr et al. 2002).

A partir de 1950, passaram a ser descritos surtos de poliomielite em diversas cidades do interior do país. Em 1953, ocorreu no Rio de Janeiro, a maior epidemia já registrada na cidade, com 746 casos notificados, atingido o coeficiente de 21,5 casos por 100 mil habitantes (Rizi 1984, MS 1988).

No Brasil, as atividades de vacinação sistemática contra a poliomielite foram introduzidas em 1961, com a inclusão da vacina oral na rotina dos serviços de saúde pública.

As primeiras campanhas com a vacina oral contra a poliomielite ocorreram em projetos experimentais nas cidades de Petrópolis-RJ e Santo André-SP (MS 2003).

Os programas de imunização não tiveram, entretanto, a abrangência e as continuidades necessárias para o controle da doença, resultando na permanência da poliomielite como um importante e sério problema de saúde pública. Dados nacionais sobre a incidência da doença, disponíveis a partir de 1968, indicavam até 1980, a notificação de 1.100 a 3.600 casos anuais. O problema se configurava ainda, pela ocorrência frequente de surtos de variável magnitude, nos mais diversos pontos do território nacional e, pela demanda significativa aos serviços de fisioterapia, de sequelas paralíticas atribuídas à poliomielite (MS 1988).

A partir do início da década de 1960, as atividades de diagnóstico laboratorial da poliomielite tiveram grande impulso no Brasil, possibilitando estudos de maior envergadura. Os trabalhos realizados, apesar de isolados, mostram que as características básicas da epidemiologia da poliomielite no Brasil não foram significativamente alteradas pelo emprego da vacina. Observou-se apenas, como seria de se esperar, que a poliomielite passou a incidir preferentemente nos grupos socioeconômicos mais baixos, já que a vacinação atingia principalmente as camadas mais altas da sociedade (Schatzmayr et al. 2002, Campos et al. 2003).

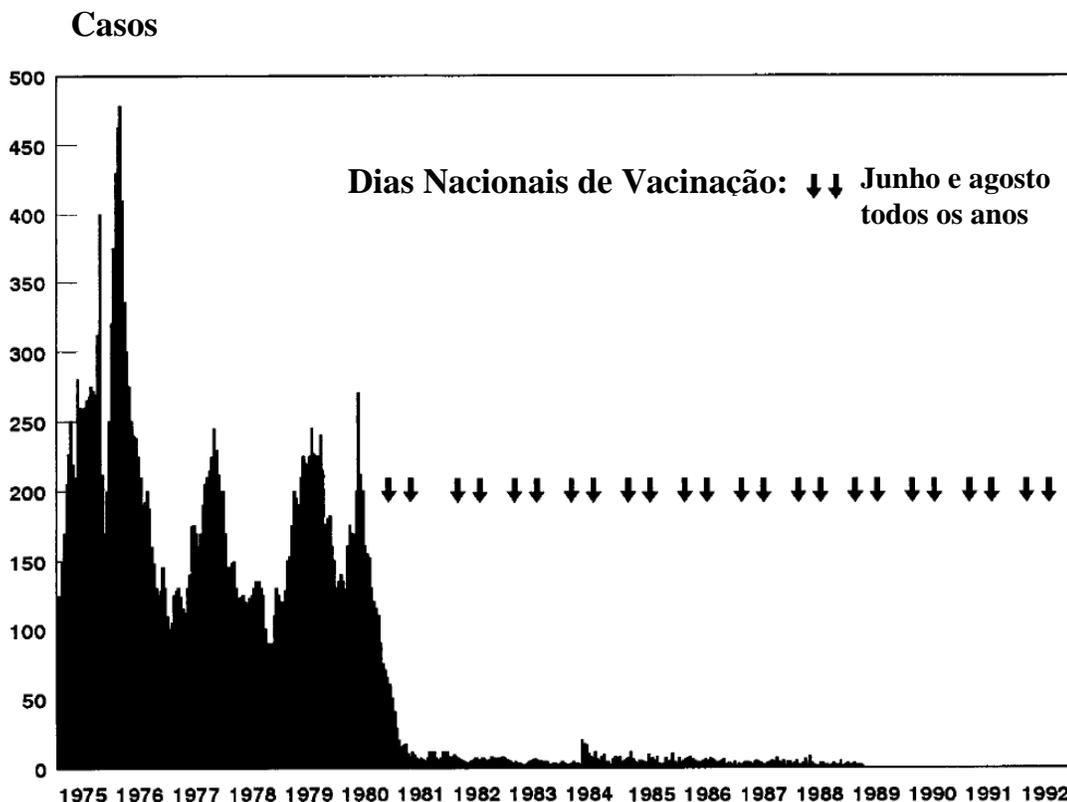
Visando controlar enfermidades infecciosas de grande morbimortalidade no país foi criado em 1973 o Programa Nacional de Imunizações (PNI). Um dos objetivos era de promover o controle não apenas da poliomielite, mas também do sarampo, tuberculose, difteria, tétano, coqueluche e manter erradicada a varíola (MS 2003).

A partir de 1975, as ações de vigilância epidemiológica relativas à poliomielite foram intensificadas pelo Ministério da Saúde, com a sistematização dos procedimentos de investigação de casos e surtos, incluindo a confirmação laboratorial do diagnóstico clínico. Esses procedimentos proporcionaram um conhecimento satisfatório sobre as características principais do comportamento epidemiológico da poliomielite em nosso meio e foram essenciais para a formulação de um programa eficaz de erradicação (Risi 1984, MS 1988).

A gravidade da situação epidemiológica da poliomielite no Brasil, em virtude da insuficiência da rede de serviços básicos de saúde para proceder rotineiramente à vacinação sistemática da população suscetível, levou o Ministério da Saúde, em 1980, a modificar a estratégia operacional de imunização contra a doença (Risi 1984). A partir deste ano, com a implantação das campanhas de vacinação em massa, através da utilização da vacina oral contra a poliomielite, o Brasil experimentou uma drástica redução no número de casos de poliomielite paralítica (Risi 1984, MS 1988). A realização das campanhas nacionais em um

só dia, repetidas sistematicamente duas vezes por ano, normalmente nos meses de junho e agosto, foi o principal fator responsável por esta redução (Figura 1.1).

Figura 1.1: Número de casos confirmados de poliomielite no Brasil de 1975 a 1992.



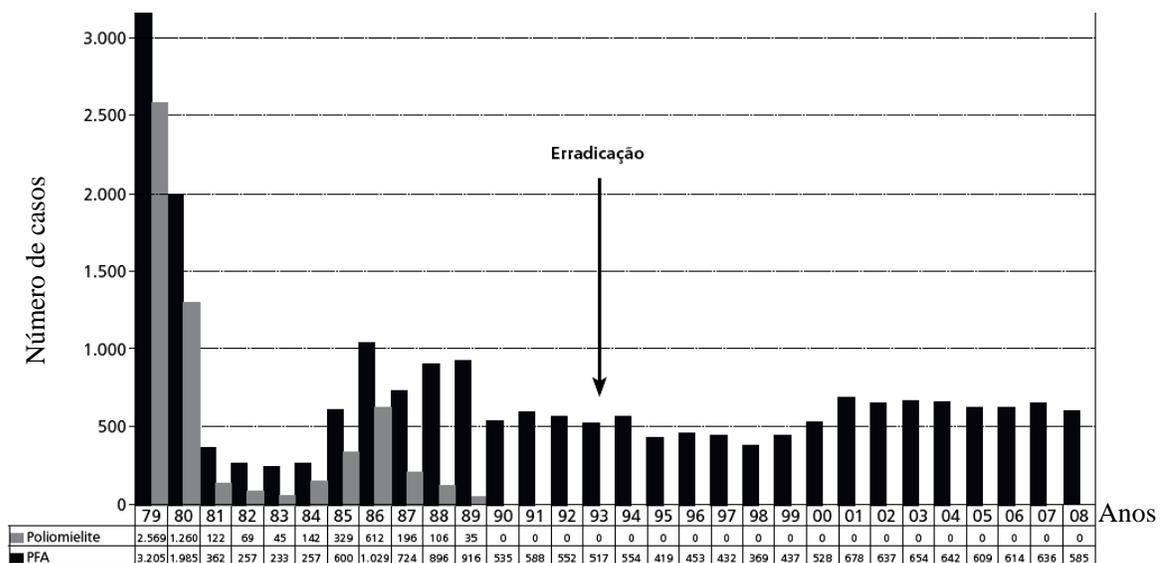
Fonte: DNE-SNABS, Ministério da Saúde e OPAS

Distribuição temporal por mês do número de casos de poliomielite (por vírus selvagem) no Brasil no período de 1975 a 1992. As setas indicam os dias nacionais de vacinação com a vacina oral contra a poliomielite realizadas nos meses de junho e agosto, anualmente. Os dados evidenciam o sucesso na redução do número de casos, fato que levou à eliminação da poliomielite no país em 1989, permanecendo até os dias atuais.

De 1980 a 1983, as coberturas vacinais atingiram cerca de 100% da população alvo (crianças até cinco anos), levando a uma efetiva diminuição do número de casos, de 2.564 em 1979 para 45 em 1983. Estes resultados levaram a Organização Panamericana da Saúde (OPAS) e o Fundo das Nações Unidas para a infância (Unicef) a recomendar a mesma estratégia para os países latinoamericanos (MS 2003). Essa redução significativa dos casos gerou, provavelmente, uma falsa impressão de que a doença estava sob controle, o que levou a uma queda acentuada nos níveis de cobertura vacinal, causando um aumento no número de

casos da doença para 142 em 1984, 329 em 1985 e 612 em 1986, quando houve uma epidemia em vários estados do nordeste brasileiro causada pelo poliovírus do tipo 3 (Figura 1.2). Este fato determinou, em 1987, assim, a mudança na formulação da vacina oral contra a poliomielite, com o objetivo de aumentar a concentração do poliovírus tipo 3. Em 1988 esta nova formulação da vacina, com uma maior concentração do sorotipo 3, foi adotada pela OPAS para os demais países (WHO1999, MS 2003). Nos três anos, após a última epidemia de poliomielite ocorrida no Brasil em 1986, foram confirmados 196, 106 e 35 casos de poliomielite parálitica no Brasil, respectivamente nos anos 1987, 1988 e 1989 (Schatzmayr et al. 2002, MS 2003) (Figura 1.2). A situação mais grave, na época, localizava-se nas áreas urbanas com menor condição sanitária, particularmente na região nordeste do país (Campos et al. 2003).

**Figura 1.2: Número de casos confirmados de poliomielite e notificados de paralisia flácida aguda (PFA). Brasil, 1979 a 2008.**



Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde

Distribuição temporal por ano do número de casos de PFA e dos casos de poliomielite (por vírus selvagem) no Brasil no período de 1979 a 2008. A investigação de casos de PFA acompanha os indicadores internacionais de vigilância epidemiológica. A seta indica a eliminação dos poliovírus na Região das Américas.

Em março de 1989 foi isolado o último poliovírus de origem selvagem no Brasil, a partir de um caso de paralisia ocorrido no município de Souza no estado da Paraíba (MS 2003). Esta cepa do poliovírus selvagem do tipo 1, representativa do genótipo que circulava no Brasil no período, não foi mais detectado a partir desta data. Na Região das Américas, outros dois genótipos do sorotipo 1, além do citado acima, foram identificados e o genótipo que circulava em alguns países da América Central e no México foi o primeiro a ser eliminado, em 1987. O terceiro genótipo do sorotipo 1 foi o responsável pelo último registro de poliovírus selvagem nas Américas em 1991, no Peru, cujo genótipo também circulava na Venezuela, Colômbia e Equador (Kew et al. 1995).

O Brasil, em 1994, juntamente com os demais países da Região das Américas, recebeu da Comissão Internacional para a Certificação da Erradicação da Poliomielite, o certificado de erradicação da circulação do poliovírus selvagem. No entanto, são recomendadas a manutenção da vigilância epidemiológica e imunização, tendo em vista a existência, ainda hoje, em diversos países, de reservatórios de poliovírus selvagens que poderiam ser reintroduzidos no país (PAHO 1994, MMWR 1994).

#### **1.1.2.1. Vigilância Epidemiológica da poliomielite**

A vigilância epidemiológica das paralisias flácidas agudas (PFA), que tem como principal objetivo manter erradicada a poliomielite no Brasil, encontra-se hoje dentro das atribuições da Coordenação de Vigilância de Doenças de Transmissão Respiratória e Imunopreveníveis (COVER) na Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS). A suspeita de poliomielite em indivíduos de qualquer idade, bem como os casos de PFA em menores de 15 anos, é de notificação e investigação obrigatórias imediatas com o objetivo de monitorar sua ocorrência. Hantavirose, raiva humana, cólera, febre amarela, síndrome respiratória aguda grave e varíola estão entre as doenças igualmente classificadas como de notificação compulsória para casos suspeitos ou confirmadas (MS 2009). Os critérios utilizados para definição de um caso de PFA são apresentados abaixo e a Figura 1.3 ilustra o fluxo a ser seguido após o diagnóstico.

#### **Caso suspeito de Poliomielite**

- Todo caso de deficiência motora flácida, de início súbito, em pessoas menores de 15 anos, independente da hipótese diagnóstica de poliomielite.

- Caso de deficiência motora flácida, de início súbito, em indivíduo de qualquer idade, com história de viagem, nos últimos 30 dias, a países com circulação de poliovírus selvagem.

### **Caso de Poliomielite Confirmado**

- Poliovírus selvagem – caso de PFA, em que houve isolamento de poliovírus selvagem na amostra de fezes do caso, ou de um de seus contatos, independente de haver ou não sequela, após 60 dias do início da deficiência motora.

- Poliovírus derivado vacinal (PVDV) – caso de PFA com isolamento de PVDV e sequela, 60 dias após déficit motor, ou seja, isolamento de poliovírus que apresentar entre 1 a 15% de diferença genética em relação ao vírus vacinal correspondente.

### **Poliomielite compatível**

- Caso de PFA que não teve coleta adequada de amostra de fezes e que apresentou sequela aos 60 dias, ou evoluiu para óbito, ou teve evolução clínica ignorada.

### **Caso Descartado (não poliomielite)**

- Caso de PFA no qual não houve isolamento de poliovírus selvagem na amostra adequada de fezes, ou seja, amostra coletada até 14 dias do início da deficiência motora, em quantidade e temperatura adequadas.

### **Poliomielite associada à vacina**

- Casos de PFA em que há isolamento de vírus vacinal na amostra de fezes e presença de sequela compatível com poliomielite, 60 dias após o início da deficiência motora. Há dois tipos de poliomielite relacionados com a vacina:

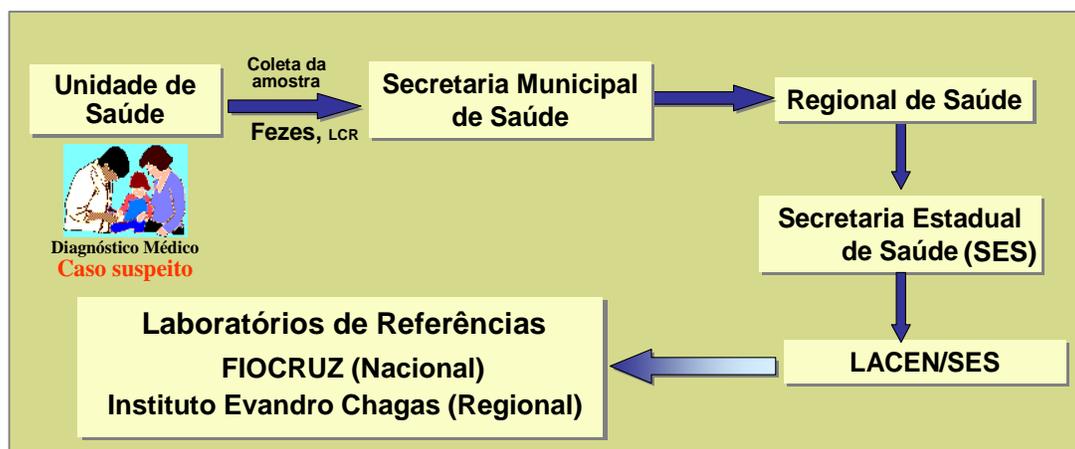
i) Paralisia flácida aguda, que se inicia entre 4 e 40 dias após o recebimento da VOP e que apresenta sequela neurológica, compatível com poliomielite 60 dias após o início do déficit motor;

ii) Caso de poliomielite associado à vacina em contatos: PFA que surge após contato com criança que tenha recebido VOP até 40 dias antes. A paralisia surge de 4 a 85 dias após a exposição ao contato vacinado e o indivíduo apresenta sequela neurológica compatível com poliomielite, 60 dias após o déficit motor.

Em qualquer das situações acima, o isolamento de poliovírus vacinal nas fezes e a presença de sequela neurológica compatível com poliomielite são condições imprescindíveis para que o caso seja considerado como associado à vacina (MS 2009).

A criação do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) no início dos anos 1990 veio substituir o Sistema de Notificação Compulsória de Doenças (SNCD) no qual a poliomielite estava inserida. Esta substituição veio tentar sanar as dificuldades do SNCD, tendo em vista o razoável grau de informatização já disponível no país. O SINAN é operado desde sua implantação, em 1993, até hoje, a partir das unidades de saúde, com a coleta e o processamento dos dados dos agravos que constam na lista de notificação compulsória em todo o território nacional, onde, desde o nível local, a poliomielite, sob a classificação CID 10-A80, pode ser notificada (MS 2009).

FIGURA 1.3: Fluxograma de coleta de amostras de fezes para pesquisa de enterovírus



Fonte: MS 2009 adaptado por Eliane Costa

## 1.2. Os Poliovírus

Os poliovírus são os membros arquétipos do gênero *Enterovirus*, classificados em três sorotipos distintos identificados como tipo 1, tipo 2 e tipo 3 que se replicam no aparelho digestivo (Hogle et al. 1985). O poliovírus foi o primeiro enterovírus a ser identificado e, embora sua caracterização como tal só tenha ocorrido 50 anos após a sua descoberta é,

possivelmente, o mais bem conhecido de todos os vírus de seu gênero (Wimmer 1993, Melnick 1996). Após cem anos da sua descoberta, os poliovírus ainda permanecem sendo um dos vírus mais estudados e o modelo mais bem entendido para os virologistas moleculares. Embora tenham sido muito investigados como modelo viral, aspectos de sua patogênese não foram ainda estudados em profundidade pela deficiência na disponibilidade, com exceção de macacos do velho mundo, de modelos animais. Questões fundamentais como a identificação das células alvo durante a fase de infecção ou o mecanismo de disseminação ainda não estão completamente esclarecidas (Mueller 2005).

### 1.2.1. Classificação

Os *Enterovirus*, vírus pertencentes à família *Picornaviridae*, classificada na ordem *Picornavirales*, causam inúmeras doenças em seres humanos e animais inferiores e são assim denominados porque geralmente infectam o trato alimentar e são eliminados nas fezes (Oxman 1999). A ordem *Picornavirales*, proposta por Gall e colaboradores em 2008, é composta por cinco famílias *Dicistroviridae*, *Iflaviridae*, *Picornaviridae*, *Marnaviridae* e *Secoviridae*. A família *Picornaviridae* (pico=pequeno; rna=ácido ribonucleico) é composta por 12 gêneros. Recentemente, esta classificação veio sendo alterada em relação aos gêneros que a compõe. Uma nova classificação para os membros do gênero *Enterovirus* humano foi proposta, com base no relacionamento genético inferido pela análise do gene que codifica a principal proteína do capsídeo viral, VP1. O sequenciamento nucleotídico completo da VP1 possibilitou, além da tipagem de enterovírus considerados “não tipados”, por métodos tradicionais, também a descoberta de mais de 30 novos sorotipos de *Enterovirus*, distribuídos, inicialmente, em cinco espécies (HEV A-D e Poliovírus) (Picornavirus Homepage em 05-01-11). A definição de espécies dentro da família *Picornaviridae* se baseia na relação filogenética entre os sorotipos ou cepas em que normalmente compartilham (i) um número limitado de hospedeiros e receptores celulares, (ii) um significativo grau de compatibilidade em processos proteolíticos, replicação, encapsidação e recombinação genética e (iii) mapas com identidade genômica (King et al. 2000). Devido ao grande relacionamento genético dos poliovírus e os vírus da espécie C (HEV-C), foi proposto em 2007 ao International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) e aceito em 2008 a incorporação dos poliovírus à espécie C (Knowles et al. 2008), sendo atualmente classificado os enterovirus humanos em quatro espécies como detalhado no Quadro 1.1 (Caro et al. 2001, Norder et al. 2003, Bailly et al. 2004, Oberste et al. 2003, 2004, 2005, Stanway et al. 2005, Smura 2007, Picornavirus Home Page). Com a redução significativa dos custos relativos ao sequenciamento

nucleotídico e a maior facilidade da técnica, o número de investigações em sequências virais conhecidas e também desconhecidas aumentou exponencialmente, levando, conseqüentemente, a descobertas de novos vírus (Fauquet & Fargette 2005).

**Quadro 1.1: Classificação dos enterovírus humanos baseada em seu relacionamento filogenético.**

Enterovírus Humano A (HEV – A)	Enterovírus Humano B (HEV – B)	Enterovírus Humano C (HEV – C)	Enterovírus Humano D (HEV – D)
Coxsackievírus A2 (CV-A2), CV-A3, CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A7, CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16, Enterovírus 71 (EV-A71), EV-A76, EV-A89, EV-A90, EV-A91, EV-A114, Simianvirus-91 (SV-91), SV-43, SV-46, A-13 e EV-A92	Coxsackievírus B1 (CV-B1), CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5, CV-B6, CV-A9 Echovírus 1 (E-1) E-2, E-3, E-4, E-5, E-6, E-7, E-9, E-11, E-12, E-13, E-14, E-15, E-16, E-17, E-18, E-19, E-20, E-21, E-22, E-23, E-24, E-25, E-26, E-27, E-29, E-30, E-31, E-32, E-33 EV-B69, EV-B73, EV-B74, EV-B75, EV-B77, EV-B78, EV-B79, EV-B80, EV-B81, EV-B82, EV-B83, EV-B84, EV-B85, EV-B86, EV-B87, EV-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98, EV-B100, EV-B101, EV-B106, EV-B107, EV-B110, SA5	Poliovírus 1 (PV-1) PV-2, PV-3, Coxsackievírus A1 (CV-A1), CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A18, CV-A19, CV-A20, CV-A21, CV-A22, CV-A24, EV-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113 e EV-C116	EV-D68 EV-D70, EV-D94 e EV-D111

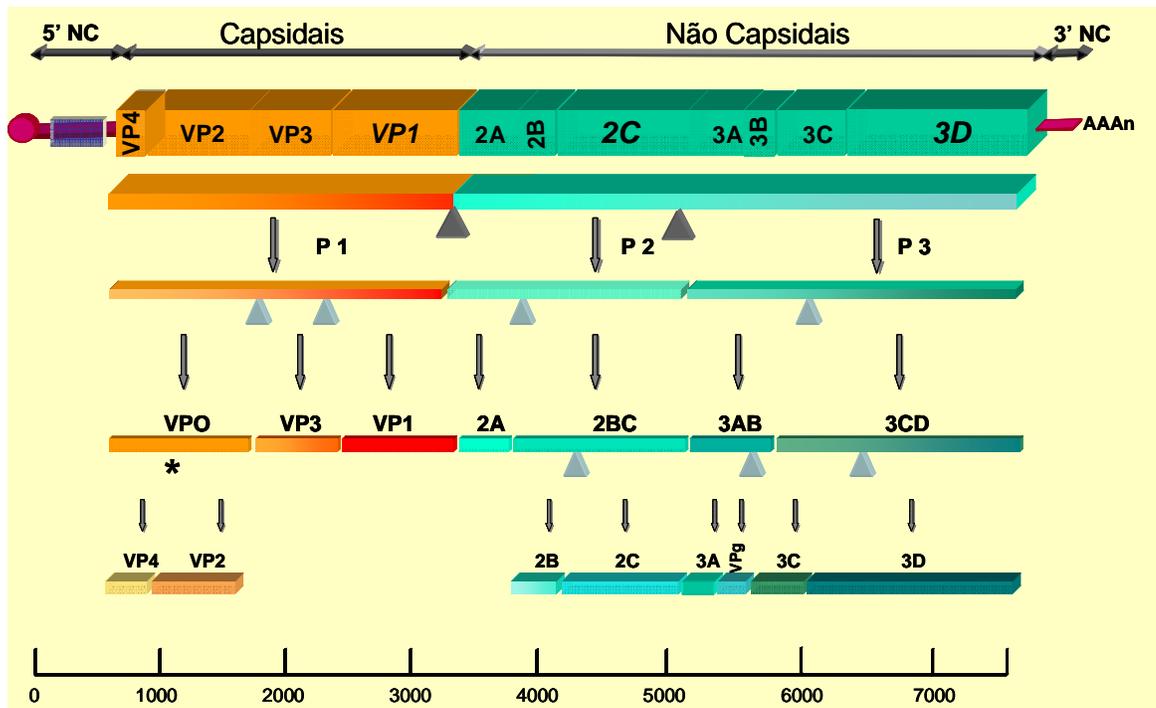
Fonte: Caro et al. 2001, Norder et al. 2003, Bailly et al. 2004, Oberste et al. 2003, 2004, 2005, Stanway et al. 2005, Smura 2007, Picornavirus Home Page acessada em 05-01 e 26-06-11.

### 1.2.2. Estrutura e organização do genoma dos enterovírus

Os poliovírus, assim como os demais membros da família *Picornaviridae*, possuem uma estrutura genômica composta por um RNA de uma única fita de polaridade positiva, com um peso molecular em torno de  $2,6 \times 10^6$  daltons (aproximadamente 7.500 nucleotídeos), que é o próprio RNA mensageiro com uma cauda poliadenilada de 70 a 100 resíduos na terminação 3' e que carrega uma pequena proteína, VPg, covalentemente ligada em sua extremidade 5'. São vírus pequenos, esféricos, que não possuem envelope e têm aproximadamente 30 nm de diâmetro (Racaniello 1988, Rueckert 1996, Oxman 1999). O RNA contém uma única fase de leitura aberta (ORF, do inglês open reading frame) que codifica uma longa cadeia de polipeptídeos, a poliproteína, com peso molecular de aproximadamente 240 Kda, que é clivada durante a tradução do genoma viral. Assim sendo, a proteína de comprimento total não é formada (Hogle et al. 1985). Estas clivagens são determinadas pelas proteinases codificadas pelo vírus e que geram diversos produtos protéicos com diferentes funções, tais como proteínas do capsídeo, proteinases e RNA polimerases (Wimmer 1993, Rueckert 1996) (Figura 1.4). A partícula é constituída por 60 cópias de cada uma das proteínas que constituem o capsídeo viral e que são identificadas como VP1, VP2, VP3 e VP4. Essas proteínas se organizam com simetria icosaédrica contendo o RNA adequadamente acondicionado em seu interior (Hogle et al. 1985).

Em uma sequência de reações proteolíticas, o segmento P1, precursor das proteínas do capsídeo, é clivado em três polipeptídeos: VP0, VP3 e VP1 que permanecem associados sob a forma de “protômeros”, cada um com uma massa molecular de 90.000 a 100.000 daltons, mas que rapidamente se agregam para formar pentâmeros [(VP0,VP3,VP1)<sub>5</sub>]. Os pentâmeros, a seguir, se agregam para formar o procapsídeo [(VP0,VP3,VP1)<sub>5</sub>]<sub>12</sub>. O empacotamento do RNA leva a uma quebra espontânea de maturação, na qual a VP0 é clivado em VP4 e VP2. Os polipeptídeos VP1, VP2 e VP3 estão expostos na superfície do vírion, enquanto que VP4 fica internalizado no cerne do RNA (Hogle et al. 1985).

FIGURA 1.4: Estrutura Genômica dos *Enterovirus*



Representação esquemática do genoma do poliovírus. A única fase de leitura aberta (ORF) está indicada pelo retângulo, flanqueada pelas regiões 5' e 3'NC; uma pequena proteína VPg (codificada pelo intervalo da sequência) que está covalentemente ligada a região 5'NC e representada por um círculo na terminação 5'. O "Internal Ribosome entry site" (local da entrada do ribossoma), na região 5'NC é mostrado no retângulo violeta (nucleotídeos nas posições 130 a 600). Imagem produzida por Eliane Costa. Fonte: Hogle et al. 1985; Kew et al. 2005.

O RNA purificado de enterovírus tem a capacidade de iniciar a síntese de vírions infecciosos completos *in vitro* em extratos sem células, obtidos a partir de células susceptíveis (Molla et al. 1991). A análise da estrutura tridimensional revelou que cada uma das três grandes proteínas do capsídeo VP1, VP2 e VP3 (peso molecular médio de 30 kd) forma uma barreira beta antiparalela de oito fitas (Hogle & Filman 1989). Esse padrão de dobra é extremamente conservado nas proteínas do capsídeo de vírus RNA eucarióticos icosaédricos. As 60 cópias da pequena proteína do capsídeo, VP4 (peso molecular de 7 kd), por sua vez, delimitam a superfície interna do capsídeo (Paul et al. 1987).

As fitas beta das proteínas do capsídeo, que formam as barreiras beta, estão conectadas por alças de aminoácidos, que são características para cada uma das três proteínas

do capsídeo e que “decoram” a superfície externa do vírion (Hogler & Filman 1989). Na resposta imune ao vírus, anticorpos capazes de neutralizar a infectividade viral são normalmente produzidos contra essas sequências curvas, que são, portanto os componentes mais importantes dos sítios antigênicos de neutralização (N-Ags). Os poliovírus possuem quatro N-Ags (Minor 1990). Interessantemente, existem apenas três conjuntos únicos desses quatro sítios, e, deste modo, apenas três sorotipos de poliovírus, sorotipos 1, 2 e 3, são observados na natureza. Os anticorpos produzidos contra o sorotipo 1 não são capazes de neutralizar significativamente a infectividade dos sorotipos 2 ou 3. Até o final dos anos 1980s não se tinha evidenciado a ocorrência de recombinação dos poliovírus nas proteínas capsidais, mas no início do século XXI, estudos indicaram a possibilidade deste tipo de recombinação ocorrer de forma natural (Savolainen-Kopra et al. 2009). Mudanças antigênicas, com o surgimento de novos sorotipos, não têm sido observadas nos poliovírus e, assim, novos sorotipos de poliovírus, até o momento atual, não têm sido identificados. Levando-se em conta a plasticidade dos genomas virais constituídos por RNA, a estabilidade genética observada nos três sorotipos de poliovírus é surpreendente e não é bem compreendida (Wimmer et al. 1993).

### **1.2.3. Ciclo de Replicação**

Os estudos iniciais sobre replicação viral elegeram o poliovírus como o modelo para a análise da replicação de vírus RNA. O trabalho de Baltimore (Baltimore 1969), em particular, forneceu uma detalhada descrição do genoma do poliovírus, do mecanismo de replicação do RNA, do processo proteolítico posterior à tradução da poliproteína e da morfogênese do vírion icosaédrico, o que serviu como um modelo para os picornavírus em geral. A infecção por um picornavírus é iniciada pela adsorção através do acoplamento da partícula viral na parte N terminal no domínio V do receptor CD155, também chamado hPVR, localizado na superfície da molécula da família das imunoglobulinas (Solecki 1999). Os três sorotipos de poliovírus reconhecem o mesmo receptor celular (CD155) (He et al. 2000). Os humanos são os únicos hospedeiros para os poliovírus, mas, no entanto, macacos podem ser experimentalmente infectados, pois expressam receptores homólogos ao hPVR (Solecki et al. 1997). Após a adsorção, ocorre a penetração e perda do capsídeo já no interior da célula hospedeira. O material genômico é liberado e traduzido sob o controle do IRES, um sítio localizado na região 5'NC (na posição entre os nucleotídeos 130 e 600) que possuem uma estrutura altamente conservada (Kew et al. 2005). A proteína VPg é removida do RNA viral pelas enzimas celulares. O RNA, agindo como RNAm, é traduzido sem interrupção em uma

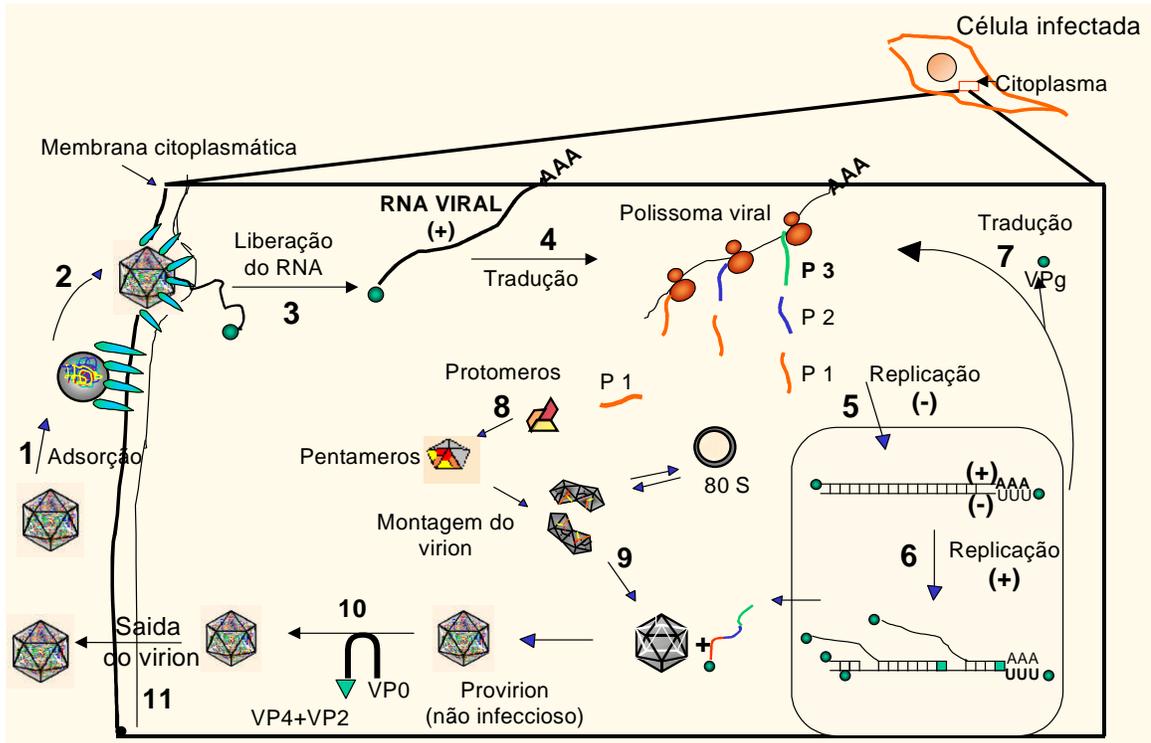
única poliproteína, autocataliticamente clivada nos intermediários P1, P2 e P3. O intermediário P1 é então clivado para produzir inicialmente VP0, VP1 e VP3 e finalmente as quatro proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP4 (Figura 1.5). A região P2 codifica as três proteínas não estruturais, sendo uma delas com atividade de protease (2A<sub>pro</sub>), enquanto a região P3 codifica para quatro proteínas, incluindo a RNA-polimerase, que é RNA-dependente e necessária para a replicação do RNA (Baltimore & Girard M 1966, Baltimore 1969).

A síntese do RNA viral tem lugar em uma sequência de eventos onde tomam parte as moléculas molde de RNA viral e as RNA polimerases codificadas pelos vírus, além de outras proteínas virais e celulares (Rueckert 1996). Todo este processo ocorre no interior do citoplasma da célula infectada, fortemente associado à estrutura do retículo endoplasmático liso. A primeira etapa na replicação do RNA viral é copiar o RNA genômico para formar uma fita complementar de polaridade negativa, a qual servirá de molde para a síntese de novas fitas de polaridade positiva. A síntese da fita complementar é iniciada na extremidade 3'NCR do genoma viral com a utilização da proteína VPg, covalentemente ligada a resíduos de uridina (VPg-UUU) como “primer” (iniciador). A partir de uma fita complementar de polaridade negativa, várias fitas nascentes de RNA, com polaridade positiva, são transcritas simultaneamente pela RNA polimerase viral, formando o chamado intermediário replicativo (Rueckert 1996, Racaniello 2001).

Durante o início da replicação, parte do RNA positivo retorna ao citoplasma para a tradução de mais proteínas, enquanto outra parte permanece no retículo endoplasmático liso para a formação de mais centros de replicação de fita positiva. Posteriormente, as fitas positivas de RNA são acumuladas até serem empacotadas no interior dos capsídeos virais. As partículas completas são liberadas pela desintegração da célula hospedeira (Watson et al. 1987, Rueckert 1996) (Figura 1.5).

O tempo necessário para um ciclo de replicação completo, desde a infecção até a completa montagem do vírus, quando ocorre o efeito citopático (ECP), varia, geralmente, de 5 a 10 horas, dependendo de algumas variáveis, como: pH, temperatura, sorotipo do vírus, célula hospedeira, estado nutricional da célula e o número de partículas que a infectaram. Em condições ótimas, pode ocorrer a biossíntese de 25.000 a 100.000 partículas virais por célula, mas somente 0,1% a 10% destas são infecciosas (Moore & Morens 1984).

FIGURA 1.5: Ciclo de replicação dos picornavirus



#### 1.2.4. Patogenia

O trato respiratório superior, particularmente a orofaringe, é a porta de entrada para a maioria dos enterovírus. A replicação na faringe e a viremia podem ocorrer durante o período de incubação, isto é, antes do desenvolvimento da doença. Os poliovírus podem ser isolados da faringe durante a primeira semana da doença e das fezes até 4 a 6 semanas, após o aparecimento da doença. A infecção do trato alimentar inferior ocorre porque os enterovírus podem sobreviver ao meio ácido e proteolítico do estômago e ao meio alcalino do duodeno (Moore & Morens 1984).

A viremia primária resulta em uma disseminação do vírus em diferentes tecidos. Existem evidências de que a replicação pode ocorrer em células do sistema do retículo endotelial (SRE) e no endotélio vascular (Racaniello 1988). Na maior parte das vezes, a infecção limita-se apenas à multiplicação viral no tubo digestivo e à invasão dos gânglios regionais, não ocorrendo, conseqüentemente, a viremia. Esta proliferação é, no entanto, suficiente para conferir ao infectado, títulos de anticorpos protetores para a vida toda (Diamant & Kok 1991).

A chamada etapa neurológica ocorre em um a cada mil indivíduos susceptíveis infectados pelos poliovírus. A invasão do SNC pode ocorrer pela via neural ou pela via hematogênica. No caso de cepas particularmente neurotrópicas, Bodian foi capaz de demonstrar a invasão do SNC pela via neural, embora se acredite que, na maior parte das vezes, o poliovírus atinge o sistema nervoso durante a fase de viremia que ocorre em torno do sétimo dia de infecção, com uma duração de três a cinco dias (Da Silva et al 2005).

Embora Sabin (1956) tenha demonstrado que o vírus poderia alcançar o SNC pela via neural, experimentos posteriores (Jubelt et al. 1980) demonstraram que o SNC é acometido pela via neural após o poliovírus ter alcançado o SNC pela viremia. Além do mais, a presença de anticorpos circulantes que neutralizam e previnem a ocorrência da poliomielite parálitica, claramente suporta a importância da viremia como via de disseminação viral para o SNC. Controversamente, outros estudos têm sugerido que os poliovírus possam penetrar nas áreas do SNC através dos nervos periféricos ou cranianos (Pallansch & Roos 2001). Assim, diante do exposto, fica claro que a maneira pela qual os poliovírus ganham acesso ao SNC é ainda é uma matéria controversa.

Durante a etapa neurológica ocorre proliferação intraneural dos vírus e, conseqüentemente, o quadro clínico depende do número de neurônios motores agredidos. Os primeiros sinais de paresia surgem somente quando há destruição de cerca de 60% dos neurônios correspondentes a um determinado grupamento muscular. A função desse agrupamento, permitindo a elevação contra a força da gravidade, é mantida com apenas 20% dos motoneurônios íntegros. A proliferação viral é inibida pela resposta imunológica do indivíduo infectado e alguns neurônios, inicialmente agredidos, podem recuperar paulatinamente suas funções, o que explicaria a regressão de algumas paresias, observada na fase pós-febril imediata e até seis meses após a fase aguda (Diament & Kok 1991).

O poliovírus apresenta elevada ubiquidade e, da mesma forma que o vírus do sarampo, infecta 100 % dos indivíduos suscetíveis que se encontram em seu raio de ação (Diament & Kok 1991). Quando um indivíduo suscetível é exposto a um poliovírus selvagem, a resposta pode ser:

- 1) Infecção inaparente (>90 - 95% dos casos) – os vírus podem ser encontrados na garganta e/ou fezes, mas o paciente é assintomático;
- 2) “Doença abortiva” (4% - 8%) - também conhecida como “doença menor”, pode incluir febre, náuseas, vômitos e infecção respiratória semelhante à gripe, em várias combinações. Esses sintomas não são usualmente associados à pleocitose do liquor e não há envolvimento do SNC;

- 3) Meningite asséptica ou poliomielite não paralítica (1% - 2%) – o paciente pode apresentar sinais prodrômicos compatíveis com a doença abortiva como descrito acima, seguido por invasão viral do SNC, o que causa doença similar à meningite asséptica. Esta forma inclui várias manifestações da **doença menor**, porém mais grave, associada com dor e rigidez de nuca, dores musculares, sinais de Kernig e Brudzinski. Estes sinais, hiperreflexias e parestesias indicam o envolvimento dos neurônios antes da paralisia. O liquor durante esta fase mostra um aumento de até 500 células por milímetro cúbico com predominância inicialmente de polimorfonucleares e depois linfócitos. As proteínas no liquor estão normais ou levemente aumentadas no início e aumentam quando os polimorfonucleares desaparecem.
- 4) Poliomielite paralítica (0,1% - 2%) - A doença consiste normalmente de sintomas prodrômicos (semelhante à forma abortiva) que pode ser bifásica (especialmente em crianças), com irritação das meninges e eventual aparecimento de paralisia flácida assimétrica, envolvendo todos os músculos, ou paresias, envolvendo apenas alguns grupos musculares, devido ao dano espinhal e/ou bulbar causado pelo vírus (Moore & Morens 1984, White & Fenner 1994).

A paralisia pode ser espinhal, bulbar ou bulboespinhal nos casos graves. Na **forma espinhal**, a paralisia pode ser assimétrica envolvendo quaisquer grupos musculares inervados pelos neurônios motores das pernas, abdome, costas, intercostais, diafragma, braços, ombros e pescoço. Geralmente na paralisia das pernas ocorre também paralisia transitória da bexiga obrigando a sondagem vesical. A paralisia do diafragma e dos músculos intercostais é grave porque dificulta a respiração podendo acarretar asfixiamento. A paralisia pode ser localizada acometendo apenas um membro (monoplegia), dois membros (paraplegia) ou os quatro membros (quadriplegia). Na **forma bulbar** os músculos inervados pelos nervos cranianos são afetados e assim, podem ocorrer distúrbios da respiração e da circulação sanguínea, em decorrência do acometimento dos centros respiratórios e vasomotores com consequente parada cardiorrespiratória (Da Silva et al 2005).

Em mais de 90% dos pacientes que sobrevivem às formas graves, a doença torna-se estacionária durante dias a semanas após a temperatura se normalizar. Melhoras podem ocorrer dentro de um ano a dois anos, particularmente com tratamento fisioterápicos adequados. Quando extensas paralisias ocorrem na infância, há parada no crescimento dos membros e deformidades do dorso, tórax e músculos dos ombros. Entre as complicações destacam-se a obstrução das vias aéreas, atelectasia pulmonar e pneumonias. As imobilizações

longas podem levar a descalcificação dos ossos, com elevada concentração de cálcio no sangue e urina e formação de cálculos renais (Moore & Morens 1984).

#### **1.2.4.1. Síndrome pós-poliomielite**

Uma condição apresentada por muitos indivíduos que sobreviveram a um episódio anterior de poliomielite é chamada síndrome pós-poliomielítica (SPP). Esta síndrome ocorre geralmente entre 10 a 40 anos após o estabelecimento do quadro inicial de poliomielite, sendo caracterizada por fraqueza acentuada daquele grupamento muscular previamente comprometido pela ação do poliovírus. Ao contrário da doença inicial, o quadro não é de desenvolvimento súbito. É estimado que 40 a 80% dos indivíduos com história anterior de poliomielite desenvolverão SPP 15 a 40 anos após o episódio inicial (Oliveira & Quadros 2008). O principal sintoma é uma “nova” fraqueza muscular que gradualmente vai se tornando mais acentuada. Esta fraqueza é muitas vezes acompanhada por diminuição da força muscular durante as atividades físicas, dores musculares e articulares e fadiga.

A explicação mais aceita para esta síndrome é que os sintomas resultam do estresse colocado sobre os neurônios motores não danificados, inicialmente, pela ação viral. Durante o ataque inicial pelo poliovírus, muitas das células nervosas medulares (neurônios) são danificadas ou destruídas. A ausência de impulsos oriundos destes neurônios faz com que o grupamento muscular correspondente deixe de funcionar; entretanto os neurônios “sobreviventes” passam a executar a função de conexão das terminações nervosas. Após alguns anos estas células começam a ser naturalmente também destruídas o que resulta em fraqueza muscular (Orsini et al. 2010, Oliveira & Quadros 2008).

A gravidade da SPP parece estar diretamente relacionada com a intensidade do quadro inicial de poliomielite. Assim, pacientes que apresentam manifestações de envolvimento neuronal consideradas leves, se evoluírem com SPP, esta será também discreta. Por outro lado, aqueles pacientes que necessitam hospitalização ou que tenham mais do que dez anos de idade ou ainda aqueles que apresentam paralisia inicial em mais de um membro ou que requerem assistência respiratória têm uma chance maior de desenvolver um quadro de SPP mais grave (Halstea 1998, Jubelt & Agre 2000, Oliveira & Quadros 2008).

#### **1.2.5 - Resistência a agentes físicos e químicos**

O vírion maduro é uma partícula extraordinariamente estável e resistente a detergentes fortes tal como dodecil sulfato de sódio (SDS), a enzimas proteolíticas e a pH ácido. Os enterovírus possuem uma densidade de 1,34 g/ml. São relativamente sensíveis ao calor

(exceto se estabilizados com cloreto de magnésio), resistentes ao pH ácido (pH 3 a 5, de uma a três horas), às enzimas proteolíticas e também aos desinfetantes comumente utilizados nos laboratórios, tais como álcool a 70 %, Lysol 5 %, éter, deoxicolato e outros solventes lipídicos, que são capazes de destruir outros vírus tais como arbovírus, ortomixovírus ou paramixovírus. A capacidade do vírus de estabilizar-se em presença do MgCl<sub>2</sub> levou ao largo uso deste composto como estabilizante da vacina oral de poliovírus (Melnick 1996, Moore & Morens 1984, Oxman 1999). Os enterovírus podem ser estocados por anos a -70° C e, por extenso período, a -20° C apresentando pequena ou nenhuma perda de sua infectividade. Embora não seja garantido, os enterovírus em solução podem se manter infectivos por semanas quando estocados a 4° C e por dias em temperatura ambiente (Moore & Morens 1984, Melnick 1996, WHO 2004b).

Os poliovírus possuem uma relativa estabilidade principalmente em presença de material orgânico (WHO 2004b). O uso de água de esgoto tratada na agricultura, assim como de água reciclada pode, portanto, contaminar os alimentos e suprimentos de água. Os enterovírus são frequentemente detectados em amostras de águas utilizadas para lazer, consideradas aceitáveis com base na contagem de coliformes fecais. Isto pode ocorrer devido ao tratamento de esgoto, que, embora seja capaz de destruir os coliformes fecais (usadas para avaliar a qualidade sanitária da água), é inadequado no tocante ao potencial de transmissão de enterovírus. Taxas de inativação do poliovírus na natureza são fortemente influenciadas pelo meio ambiente. A infectividade dos poliovírus, se presentes no solo, está estimada em uma queda de 90% em 20 dias no inverno e de 36 horas no verão. A temperatura ambiente, a redução da infectividade é de 90% em esgoto após 26 dias; de cinco dias e meio, em água fresca e de dois dias e meio, em água salgada (WHO 2004b, Dowdle & Birmingham ME 1997).

#### **1.2.6. Estabilidade genômica dos poliovírus**

Um grande número de agentes virais de importância médica, incluindo os poliovírus, vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), vírus da Hepatite C (HCV) e influenza possui RNA como material genômico. Estes vírus se replicam exibindo taxas extremamente altas de mutação e por isso exibem uma grande diversidade genética e evolutiva quando comparado aos vírus com genoma DNA (Drake 1993).

Mutação e recombinação são mecanismos alternativos para a evolução dos poliovírus e demais enterovírus. Os enterovírus apresentam uma alta taxa de mutação durante a replicação no trato gastrointestinal humano, evento este que pode determinar o aparecimento

de “variantes antigênicas”, bem como de cepas de vírus com tropismo e virulência alterados. Este padrão de comportamento genético característico de genomas “quasiespécie” justifica o acompanhamento da evolução genômica desses agentes, bem como estudos que visem à obtenção de um melhor conhecimento acerca da epidemiologia molecular com conseqüente prevenção das doenças por eles causadas (Agol et al. 1999).

O rearranjo genômico por recombinação durante a replicação viral é um mecanismo comum de variabilidade genética e evolução em vários vírus RNA. A primeira evidência de recombinação genética de vírus RNA foi obtida com poliovírus selvagem. Evidências bioquímicas de recombinação intermolecular foram reportadas de estudos de poliovírus, do vírus responsável pela febre aftosa (FMDV) e outros vírus da família *Picomaviridae*. Vírus pertencentes a esta família, em particular os poliovírus, continuam sendo modelos de estudo sobre trocas genéticas em vírus RNA (Agol et al. 1999).

Estudos avançados em genética básica envolvendo o processo de atenuação da cepa Sabin levaram a um interesse renovado no desenvolvimento de cepas vacinas (VOP) com a estabilidade genética (Kew et al. 2005). As cepas da vacina Sabin estão sujeitas à variação genética durante a replicação em humanos. Na verdade após a administração em humanos, as partículas virais mutantes, com substituições nucleotídicas específicas, algumas relacionadas à amostra parental selvagem, são rapidamente isoladas, provavelmente por pressão seletiva exercida por fatores tais como temperatura, células alvo no hospedeiro, anticorpos neutralizantes e outros fatores desconhecidos (Minor 1992).

Quando poliovírus são inoculados e se replicam em culturas celulares, geralmente, em condições controladas, o equilíbrio das quasiespécies é mantido e pequena variação é observada com passagens seriadas. Em contraste a esta situação é o que ocorre com os poliovírus durante a replicação em humanos quando a população de vírus excretada é bastante heterogênea, considerando que existem diferentes taxas de evolução para diferentes intervalos genéticos (Nottay et al. 1981).

### **1.3. Vacinas**

O poliovírus é o único enterovírus contra o qual existe vacina disponível (Melnick 1996). Embora boas condições sanitárias e de higiene ajudem a limitar a disseminação dos poliovírus, a única prevenção específica para a poliomielite é a imunização pela vacina oral atenuada para pólio (VOP) e/ou a vacina de pólio inativada (VIP). Ambas as vacinas possuem os três sorotipos de poliovírus uma vez que a imunidade relativa a um sorotipo não é capaz de proteger contra os demais sorotipos (WHO 1997). Os dois tipos de vacinas são efetivos na prevenção da poliomielite, embora a doença ainda seja endêmica em alguns países em

desenvolvimento, principalmente em áreas tropicais, em que a cobertura vacinal não atinge completamente a população susceptível. Mesmo em populações cuja cobertura vacinal é alta, pequenos núcleos de crianças não vacinadas, particularmente aquelas muito jovens, são potencialmente susceptíveis. Para países tropicais, principalmente aqueles que possuem casos de importação de poliovírus selvagem, os esquemas primários de vacinação precisam não apenas ser iniciados bem cedo, como completados na primeira infância (Melnick 1996). Para os dois tipos de vacina (VIP e VOP) são recomendadas três doses e um reforço até o primeiro ano de vida (WHO 1997). O Brasil adota na vacinação contra a poliomielite a VOP, tanto no esquema de rotina pelo calendário de vacinação como no “Dia Nacional de Vacinação”.

O Ministério da Saúde há pouco mais de uma década tem investido na aquisição de produtos imunobiológicos de moderna tecnologia e alto custo, disponibilizados nos Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais (CRIE). O objetivo é beneficiar uma parcela da população brasileira que necessita desses imunobiológicos por apresentar suscetibilidade aumentada às doenças contra as quais eles protegem e/ou risco aumentado de complicações para si ou para outros. Estas circunstâncias podem decorrer de (i) motivos biológicos (imunodepressão, asplenia, transplante e aids); (ii) contato com pessoas imunodeprimidas (como profissionais de saúde e conviventes de imunodeprimidos); (iii) intolerância aos imunobiológicos comuns (alergia ou evento adverso grave) ou (iv) exposição inadvertida a agentes infecciosos (acidente profissional ou violência contra a pessoa). A vacina VIP é distribuída em casos específicos nestes centros (MS 2008).

As principais características e diferenças entre a vacina inativada (VIP) e a vacina oral atenuada (VOP) são mostradas no Quadro 1.2.

Quadro 1.2: Comparação entre as principais características da vacina oral contra a poliomielite (VOP) e a vacina inativada contra a poliomielite (VIP).

Características	Tipo de Vacina contra a poliomielite	
	VOP	VIP
Poliovírus	Atenuado	Inativado
Apresentação	Trivalente (PV1,PV2,PV3) Bivalente (PV1,PV3) Monovalente	Trivalente (PV1,PV2,PV3)
Imunidade	Humoral e de mucosa	Humoral
Custo por dose	US\$ 0.8 centavos	> US\$ 0.40 centavos
Administração (facilidade)	Oral (voluntários podem administrar)	Injetável (Exige pessoal especializado)
Uso em imunodeficientes	Contra indicada	Recomendada
Vacinação secundária de contatos	Sim	Não
Caso associado à vacina (evento adverso)	Muito raro (1:0,7 a 1:2,4 milhões na 1ª dose)	Não
Uso em países endêmicos para poliovírus	Indicada	Não recomendada
Era pós erradicação	Uso interrompido	Indicação provável

Fonte: Melnick 1996, WHO 1997, MS 2008, MS 2009, WHO 2009, WHO 2010c.

### 1.3.1. Vacina VOP

A VOP atenuada monovalente foi licenciada para uso na rotina em 1961 e 1962 nos Estados Unidos. Durante o período de 1960-64, a LEDERLE, uma das produtoras da vacina Sabin, utilizou mais de 1.200 macacos das espécies *Macaca mulatta* (rhesus) e *Cercopithecus aethiops* na fabricação na VOP nos Estados Unidos (Bittle et al. 1962). Em 1964, foi então introduzida a vacina trivalente que permaneceu como sendo a única formulação disponível nos programas da erradicação da poliomielite da OMS até 2005, quando foi reintroduzida a formulação monovalente para ser usada em casos de surtos e, mais recentemente, em 2009 foi liberada a formulação bivalente (WHO 2009). Para a formulação trivalente, a mais longamente usada e responsável pelo sucesso da drástica redução do número de casos, a

concentração mínima estabelecida para cada um dos componentes da vacina é de  $10^{5,5}$ ,  $10^{4,5}$  e  $10^{5,2}$  TCID<sub>50</sub> para poliovírus tipos 1, 2 e 3, respectivamente. As concentrações diferentes para cada tipo dentro da mesma vacina trivalente representam um balanço na formulação levando-se em conta a replicação mais eficiente do poliovírus vivo atenuado do tipo 2 no trato gastrointestinal, no qual, se o vírus do tipo 2 for dado na mesma concentração dos tipos 1 e 3 a replicação destes dois últimos sorotipos sofrerá interferência (Modlin 1995, WHO 1999).

Desde o início do programa para erradicação da poliomielite a OMS recomenda que crianças recebam quatro doses da VOP antes de completarem um ano de idade. Em países endêmicos, a primeira dose deve ser dada no nascimento ou o mais próximo do momento do nascimento. Esta dose é chamada de “dose do nascimento” ou “dose zero”. As demais doses devem ser dadas com um intervalo mínimo de quatro semanas e normalmente junto com a DPT. Caso a dose zero não for fornecida, a quarta dose da VOP deverá ser dada com intervalo mínimo de um mês após a terceira dose (WHO 1997). No Brasil, o calendário básico do MS para crianças estabelece a aplicação de três doses (dois, quatro e seis meses) com o reforço aos 15 meses (MS 2001).

#### **1.3.1.1. Poliomielite associada à vacina (VAPP)**

As vacinas, como todo produto farmacêutico, não são isentas de efeitos colaterais ou eventos adversos. Com uma grande proporção da população sendo vacinada a cada ano, pode ocorrer certo número de eventos adversos após a vacinação – tanto eventos apenas coincidentes, como também eventos com relação causal à vacina (MS 2009). O principal evento adverso associado com a VOP é a paralisia pós-vacinal, tanto no vacinado como no contactante (MS 2008).

Os problemas associados com a VOP estão relacionados principalmente ao fato da vacina ser constituída de vírus vivos e, por este motivo, passíveis de sofrerem mutações. Algumas cepas excretadas pelas pessoas vacinadas, particularmente as dos sorotipos 2 e 3, podem sofrer mutações as quais podem originar subpopulações virais com virulência alterada em relação à vacina administrada. Apesar de muito raro, indivíduos vacinados, e mais raro ainda, seus contatos mais próximos, podem desenvolver a poliomielite parálitica associada à administração da vacina (Melnick 1996, Moore & Morens 1984). O Quadro 1.3 apresenta a classificação, de forma resumida, dos efeitos adversos pós-vacinação com VOP (MS 2009).

**Quadro 1.3: Eventos adversos pós-vacinação com VOP**

Evento adverso	Descrição	Tempo Aplicação/evento	Freqüência	Conduta	Exame
<b>Poliomielite associada à vacina</b>	Doença aguda febril, com déficit motor flácido de intensidade variável, geralmente assimétrico, e que deixa seqüela neurológica.	Vacinado: 4-40 dias Comunicante de vacinado: 4-85 dias após a vacinação.	Por dose administrada geral: 1/ 2,4 a 1/1 3 milhões Na 1ª dose: 1/0,7 a 1/2,4 milhões	Notificar e investigar. Tratamento de suporte. Encaminhar aos Centros de Referência para continuar a vacinação com vacina inativada.	<b>Fezes: colher 1 amostra nos primeiros 14 dias após o início da deficiência motora.</b> Eletroneuromiografia.

Fonte MS 2008

Essas informações indicam que, de um modo geral, os riscos de casos associados continuam constantes. Existe a possibilidade de ocorrerem eventos adversos decorrentes de depressão imunológica em pacientes com deficiência imunológica primária. Este risco de complicação ocorre quando são utilizadas vacinas vivas como a VOP, contra o vírus do sarampo e outras. No caso das vacinas não vivas, o risco é da resposta imunológica não se processar adequadamente e o receptor da vacina continuar suscetível às doenças contra as quais se vacinou. As deficiências imunológicas, que podem ter diversos graus de gravidade e acarretar desde insignificantes a importantes riscos ao receptor, devem ser consideradas, após a aplicação de vacinas vivas. No entanto, em muitas dessas situações justifica-se utilizá-las, pois o risco da doença é maior do que o da vacina. Em outras situações, pode-se substituir a vacina viva por uma não viva, como no caso da vacina contra a poliomielite de VOP para VIP (MS 2008).

Dados epidemiológicos, durante o período de 1980 a 1994 nos Estados Unidos, indicam a média anual de oito casos associados à administração da VOP. Baseado na distribuição estimada de 303 milhões de doses de VOP durante este período, o risco geral para casos paralíticos associados à vacina durante esse período foi de um caso por 2,4 milhões de doses distribuídas; se avaliarmos em relação à criança recebendo a primeira dose de VOP, a taxa encontrada foi de um caso para 750.000 crianças vacinadas (MMWR 1997a). Nos imunocomprometidos, esse risco é mais elevado, cerca de 3.200 vezes maior que em imunocompetentes. Estudo colaborativo conduzido pela Organização Mundial da Saúde em 13 países mostrou uma taxa de um caso de paralisia associada à vacina para cada 3,2 milhões

de doses distribuídas, tanto em vacinados como em contactantes (MS 2008). No Brasil, a incidência da poliomielite associada à vacina tem sido baixa. Entre 1989 e 2003 (15 anos), foram registrados 40 casos confirmados de poliomielite associada à vacina oral, basicamente em crianças, com predomínio na primeira e segunda dose (Carvalho & Weckx 2006). O risco estimado nos estudos, para a primeira dose variou de um caso para 1,2 milhões a um caso para 2,4 milhões de doses aplicadas. Já para todas as doses, variou de um caso para 3,6 milhões um caso para 13 milhões de doses aplicadas. Embora como citado acima exista a possibilidade de ocorrerem riscos de complicações graves causadas pelas VOP e outras do calendário de imunizações, eles são muito menores do que os das doenças contra as quais elas protegem como no caso de sequelas provocadas pelo poliovírus selvagem em aproximadamente 1/250 infecções (MS 2008).

### **1.3.2. Vacina VIP**

A vacina Salk constituída por vírus inativados (VIP) foi a primeira vacina contra a poliomielite a ser licenciada, em 1955. Seu desenvolvimento levou a vários avanços na virologia: (i) cultivo do poliovírus em célula de origem não neural, (ii) a identificação dos três sorotipos de poliovírus, (iii) a descoberta de que a viremia antecedia a paralisia e (iv) a demonstração que imunoglobulinas protegiam contra a paralisia causada pelo pólio. A preparação da VIP é obtida pela inativação das cepas neurovirulentas de referência Mahoney, MEF-1 e Saukett para os sorotipos 1, 2 e 3 respectivamente, por meio de formaldeído. Uma cepa menos virulenta para o sorotipo 1, identificada como Brunenders, é utilizada para a produção da vacina inativada na Suécia e Dinamarca (Kew et al. 2005).

Indicada a partir dos dois meses de idade, geralmente é usada por via intramuscular (IM), podendo ser aplicada também por via subcutânea (SC). Não há limite de idade para a sua aplicação. Além dos vírus, contém 2-fenoxietanol e formaldeído, além de traços de neomicina, estreptomicina e polimixina B. No Brasil, sua utilização nos CRIEs está relacionada a pacientes imunodeprimidos e conviventes de imunodeprimidos. Está indicada para crianças menores de cinco anos que convivem com pacientes com a Síndrome da imunodeficiência adquirida, para adultos pós-transplante de medula óssea, por exemplo, e pacientes que tiveram efeito adverso da VOP (MS 2008).

Quando preparada e administrada adequadamente, a vacina Salk pode induzir a níveis adequados de anticorpos séricos, conferindo imunidade humoral. Esse tipo de vacina oferece a possibilidade de ser combinada com outros tipos de vacinas injetáveis, necessárias à infância tal como a DPT (difteria-tétano-pertussis) e incorporada dentro do esquema de

vacinação para bebês e crianças pequenas. Ela possui a vantagem, de não introduzir na comunidade qualquer vírus vivo que poderia ser espalhado de forma não controlada para outras pessoas não aptas a recebê-la. Em países do norte europeu em que a vacina inativada é regularmente administrada existe uma limitada circulação de poliovírus (da Silva et al. 2005).

A vacina inativada não induz a uma alta imunidade local (intestinal) e por esse motivo, o poliovírus selvagem consegue ainda se multiplicar no trato intestinal de pessoas vacinadas. Embora essas pessoas vacinadas possuam anticorpos protetores, elas são infectadas e, mesmo não desenvolvendo a doença paralítica, os vírus que são por elas excretados podem ser uma fonte de infecção para outras pessoas. Além do mais, um outro problema associado ao uso da vacina inativada é o seu alto custo, principalmente para países em desenvolvimento onde um grande número de crianças necessita receber múltiplas doses da vacina sob a forma injetável (Moore & Morens 1984, Modlin 1995, Melnick 1996).

Em maio de 2008 na 61<sup>a</sup> Assembléia Mundial da Saúde houve a concordância dos participantes de que a VIP deverá ser a única opção para países que desejarem manter imunização contra a polio por vacinação após a interrupção da VOP (GPEI 2010). Este fato deverá ocorrer aproximadamente três anos após a confirmação da interrupção global da transmissão do poliovírus e a contenção de materiais contendo o poliovírus selvagem (WHO 2006b). É uma preocupação da Assembléia Mundial da Saúde a adequação e intensificação do trabalho do GPEI para desenvolvimento de opções acessíveis para o uso da VIP na rotina usados em países com recursos reduzidos e processos de produção da vacina com maior segurança para facilitar a fabricação em áreas tropicais (GPEI 2010).

Atualmente existem cerca de 50 países ao redor do mundo que já utilizam a vacina inativada associada, nas formas trivalente (DTIPV), tetravalente (DTPIPV), pentavalente (DTPHepBIPV e DTPHibIPV) e hexavalente (DTPHibHepBIPV) (WHO 2010b). Estudos com fracionamento de doses aplicadas intradermicamente, através de equipamentos especiais que não utilizam agulhas, estão sendo testados em comparação com doses sem fracionamento pela via intramuscular visando à facilitação e a possível redução no custo para o uso em grande escala (Mohamed et al. 2010).

Nos Estados Unidos a VOP foi substituída desde 2000 pela VIP (MMWR 2000b). A utilização nos primeiros anos foi na formulação individual (não combinada) e desde 2008 é utilizada na apresentação combinada. Atualmente existem três formulações licenciadas pelo FDA que são DTaP-HepB-IPV (2002), DTaP-IPV e DTaP-IPV/Hib ambas licenciadas em 2008 e que devem ser administradas apenas pela via intramuscular (MMWR 2011).

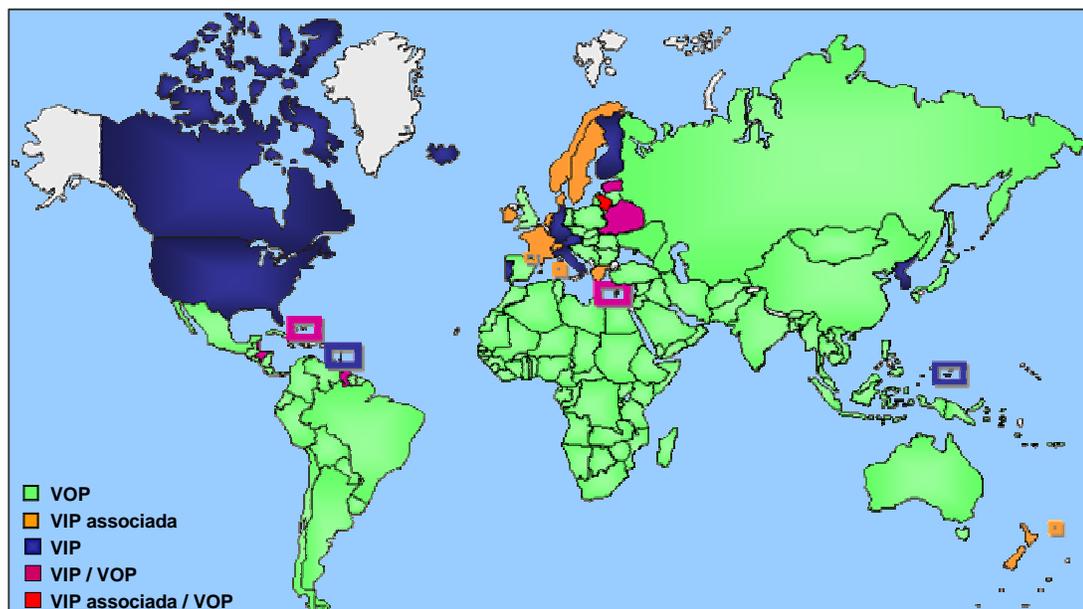
O Brasil está realizando estudos para iniciar um esquema de vacinação combinada entre os dois tipos de vacinas contra a poliomielite, a VIP e a VOP (comunicação verbal da

COVER).

### 1.3.3. Distribuição global do uso das vacinas contra a poliomielite

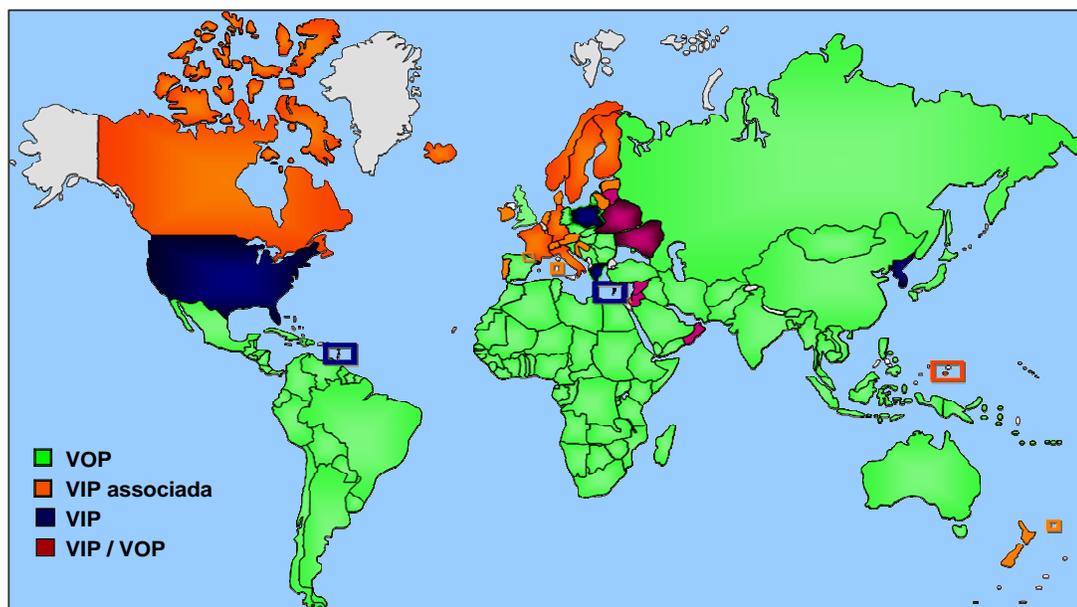
A VOP é a adotada pela OMS visando à erradicação global da poliomielite, em decorrência das características já abordadas anteriormente. Ainda hoje, a VOP continua sendo a opção indicada. Os esquemas de vacinação utilizando a VOP podem variar de acordo com a decisão de cada país. A recomendação da OMS é que a criança receba o esquema completo de vacinação contra a poliomielite até o primeiro ano de vida. Até 2002 menos de 10% dos países adotavam a vacina inativada (VIP) e hoje um pouco mais de 20% a utilizam tanto de forma individual como combinada com outros microorganismos (Figuras 1.6 e 1.7) (WHO 2010b).

FIGURA 1.6: Distribuição geográfica dos tipos de vacina contra a poliomielite utilizadas no início dos anos 2000 a 2008.



Distribuição geográfica, por país, dos tipos de vacina contra a poliomielite utilizados no início dos anos 2000 (2003). O tipo de vacina utilizada está identificado por diferentes cores. Os países na cor verde utilizavam a vacina atenuada Sabin na forma trivalente (t-VOP) em esquema completo. A cor laranja está associada à utilização da vacina inativada contra a poliomielite associada a outros agentes imunizantes em esquema completo. A cor azul está associada à utilização da vacina inativada contra a poliomielite (VIP) em esquema completo. A cor violeta está associada ao uso combinado entre a VIP e VOP em um esquema de primeira dose de VIP e as demais de VOP e a cor vermelha está associada ao mesmo esquema da cor violeta exceto que a VIP utilizada na primeira dose, apresenta outros agentes imunizantes além do poliovírus inativado. (Mapa produzido por Eliane Costa a partir dos dados da OMS (WHO 2006a).

**FIGURA 1.7: Distribuição geográfica dos tipos de vacina contra a poliomielite utilizadas após 2008.**



Distribuição geográfica por país dos tipos de vacina contra a poliomielite utilizadas após 2008 (2010). O tipo de vacina utilizada está identificado por diferentes cores. Os países na cor verde utilizavam a vacina atenuada Sabin na forma trivalente (t-VOP), bivalente (b-VOP) ou monovalente (m-VOP) em esquema completo e/ou combinados entre as apresentações da VOP. A cor laranja está associada à utilização da VIP associada a outros agentes imunizantes em esquema completo. A cor azul está associada à utilização da VIP em esquema completo. A cor violeta está associada ao uso combinado entre VIP e a VOP em um esquema de primeira dose de VIP e as demais de VOP. Mapa produzido por Eliane Costa a partir dos dados da OMS (WHO 2010b).

#### **1.4. Programa de Erradicação**

Como descrito no item 1.1, a poliomielite paralítica é conhecida no mundo há, pelo menos, 3.500 anos (Paul 1971). Hoje a poliomielite é doença rara em todos os países desenvolvidos e na quase totalidade dos países em desenvolvimento. A incidência global da poliomielite em 2009 foi de 1.604 casos, com 80% dos casos confirmados em países ainda endêmicos como a Nigéria (388), Índia (741), Paquistão (89) e Afeganistão (38). Já em 2010, de um total de 1.294 casos confirmados de poliomielite, apenas 18% foram descritos nos países considerados endêmicos, com a maioria dos casos (82%) nos países onde ocorreram a reintrodução dos poliovírus selvagens (GPEI homepage em 25-03-11). Em relação ao número de casos nos países endêmicos, este número representa um declínio significativo quando comparado com mais de 400.000 casos que costumavam ocorrer nos anos imediatamente anteriores a 1985. Este dramático sucesso é atribuído à utilização sistemática da VOP,

desenvolvida pelo Dr. Albert Sabin, dentro do Programa de Erradicação da Poliomielite, parte do Programa Ampliado de Imunizações (PAI) da OMS. Após o último caso de varíola ocorrida em 1978, a OMS estabeleceu o PAI, no sentido de se aumentar as coberturas globais de imunização para seis doenças infecciosas incluindo a poliomielite e o sarampo (Kew et al. 1993).

Durante a década de 1980, os níveis de cobertura vacinal, com o uso da vacina oral Sabin atingiram uma taxa mundial ao redor de 85%. Apesar dessa melhora, a circulação dos poliovírus selvagens continuou em muitas regiões. A OPAS lançou então o seu Programa Regional de Imunizações em 1985, no qual a meta de se erradicação de todos os poliovírus selvagens autóctones da região das Américas até o ano de 1990 tem sido estabelecida (PAHO 1985, MS 2003), o que serviu de base para o Programa Global de Erradicação da Organização Mundial da Saúde. Ainda com base no sucesso deste programa na Região das Américas, a 41ª Assembléia Mundial da Saúde, com mais de 125 países, reunidos em Genebra na Organização Mundial da Saúde, estabeleceu, em 1988, a meta da erradicação global da poliomielite até o ano 2000 (WHA 1988), mais tarde estendida para o ano de 2005. Esta meta foi recentemente prorrogada para o ano de 2012 (GPEI 2008, WHO 2010a). A partir de 1988, estratégias apropriadas foram desenvolvidas e substanciais progressos no sentido da implementação dessas estratégias foram determinados. O estabelecimento de um sistema de vigilância, preparado para detectar casos clinicamente compatíveis com poliomielite, bem como a vigilância laboratorial da circulação dos poliovírus e de outros vírus causadores de deficiência motora são de importância crítica para o programa e podem fornecer dados que permitam a certificação da erradicação da poliomielite (MMWR 1994). Em 1999 foi registrado na Índia o último caso de paralisia devido ao poliovírus selvagem do tipo 2 (MMWR 2001a).

A erradicação da poliomielite depende da vigilância efetiva global, cuja principal função é nortear as estratégias de imunização, com a verificação dos seus resultados e a certificação do sucesso das metas estabelecidas. A vigilância consiste na detecção, informação e investigação de todos os casos de PFA em pacientes com idade inferior a 15 anos e de todos os casos suspeitos de poliomielite em pacientes de qualquer idade, com a coleta de amostras fecais de cada paciente para análise laboratorial seguido pelo imediato encaminhamento dos achados virológicos aos serviços de saúde pública (WHO 1997, 2003a, 2004). Em relação à vigilância, mais especificamente, à sensibilidade da notificação, preconiza-se a utilização de indicadores internacionais, com a expectativa de identificação de, no mínimo, um caso de PFA para cada 100.000 indivíduos menores que 15 anos assim como

a coleta de amostras de fezes em condições adequadas para > 80% dos indivíduos com diagnóstico de PFA (MMWR 2001b).

Particularmente comprometido com as ações ligadas à imunização global, existe um grupo de especialistas em ações estratégicas de imunizações (SAGE) na OMS que se reúne anualmente em Genebra, na Suíça. Em sua última reunião, em novembro de 2010, foram avaliados os aspectos de controle dos surtos de poliomielite na Ásia e África por importação desta virose de países endêmicos e/ou de países que restabeleceram a circulação do poliovírus selvagem. O grupo apoiou fortemente a criação do quadro de monitoramento independente criado em outubro 2010 para acompanhar o progresso do plano estratégico para a erradicação da poliomielite. O monitoramento é realizado junto aos Ministérios da Saúde dos países visando ações corretivas e implementações de novas estratégias assim como novas ações em serviços de imunizações (WHO 2011).

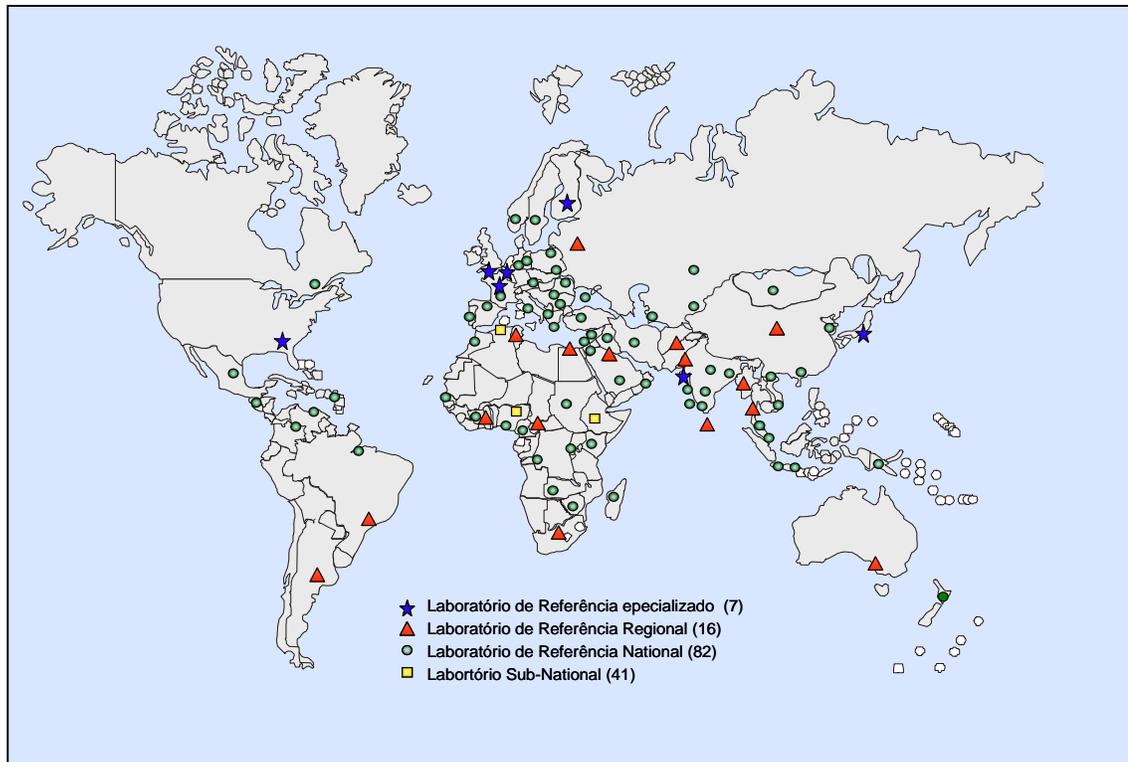
A vigilância ambiental tem sido usada de forma satisfatória na circulação e avaliação da duração da circulação do poliovírus em uma determinada população. Em vários países, os poliovírus selvagens têm sido detectados no ambiente em ausência de casos de PFA. A vigilância ambiental é também uma ferramenta potencial para o monitoramento da circulação dos poliovírus derivados da vacina (PVDV) e uma forma de avaliar a imunidade da população vacinada com a VIP (WHO 2003b). Na Finlândia, em 2010, foram detectados vários PVDV com divergência nucleotídica > 10%, indicando a replicação em humanos por mais de 10 anos (Roivainen et al. 2010).

#### **1.4.1. Vigilância laboratorial**

A principal função do laboratório na vigilância das PFAs está na confirmação da presença do poliovírus pelo isolamento viral. Em 1980, o LEV passou a atuar como laboratório central para enterovirose por determinação do Ministério da Saúde e posteriormente pelas OPAS (Schatzmayr et al. 2002). A OMS em colaboração com várias instituições criou a rede global de laboratórios para possibilitar o diagnóstico da poliomielite, após 1988. A rede atualmente é composta por 146 laboratórios classificados em quatro níveis e distribuídos nos cinco continentes (MMWR 2000a). O LEV está classificado como de Referência Regional das Américas (Figura 1.8). Esta rede possibilitou e possibilita a obtenção de informações virológicas que podem ser usadas diretamente na localização de fontes e objetivos ligados à erradicação, a verificação de casos importados e a dispersão dos poliovírus selvagens. Em países em que a circulação dos poliovírus selvagens foi interrompida, como no Brasil, a função principal está em identificar possíveis importações de

países ainda endêmicos e monitorar a circulação de PVDV (WHO 2004a). O isolamento e a identificação dos poliovírus nas fezes é o melhor método para confirmar o diagnóstico e vem sendo utilizado até o momento por todos os laboratórios que prestam este serviço a OMS (WHO 1997).

FIGURA 1.8: Rede laboratorial da OMS para a poliomielite



Localização geográfica dos laboratórios da rede global da OMS para poliomielite. Os quatro níveis de classificação dos laboratórios possuem funções e atribuições diferentes sendo os especializados os que assumem técnicas de maior complexidade e os subnacionais os de menor. Fonte: WHO 2000a, 2010d. Mapa produzido por Eliane Costa a partir dos dados da OMS (WHO 2000a, 2010d).

O papel da rede de laboratórios tornou-se de importância ainda maior durante a certificação da erradicação da poliomielite. Em 1999, com a verificação de que a erradicação não seria completada, como programado, em 2000, novas metodologias nos laboratórios da rede de poliomielite foram introduzidas pela OMS, com o objetivo de aumentar a investigação e agilizar a liberação dos resultados associado ao encaminhamento imediato dos poliovírus isolados para os laboratórios de referência regional e/ou especializados para a

caracterização intratípica e sequenciamento nucleotídico (MMWR 2000a). As técnicas moleculares atuais são capazes de caracterizar geneticamente os poliovírus. A manutenção de um banco de referência de estruturas moleculares de vírus já caracterizados permite o rastreamento de novos vírus isolados em relação a sua origem geográfica (WHO 1997). Os laboratórios da rede são monitorados anualmente desde 1994 quanto aos aspectos de gestão da qualidade com a utilização de painéis de proficiência para técnicas clássicas de isolamento viral e também para técnicas moleculares da reação em cadeia da polimerase (PCR). A OMS mantém, para os laboratórios credenciados na rede de vigilância da poliomielite, um sistema de avaliação permanente no qual a cada dois anos um supervisor designado pela própria OMS realiza uma auditoria, com base em parâmetros internacionais, de todas as atividades relacionadas à referência realizadas no laboratório.

A rede laboratorial das Américas monitorou a eliminação de oito genótipos diferentes de poliovírus selvagens autóctones desta região. O último vírus selvagem detectado na região das Américas foi de um paciente peruano com PFA cujo poliovírus foi isolado, identificado e caracterizado por PCR no laboratório da FIOCRUZ, em 1991, assim como o último caso brasileiro em 1989 (MMWR 1997b, Kew et al. 1995).

A Região das Américas recebeu o certificado da erradicação da poliomielite em 29/09/1994, após um período de três anos monitorados, tanto através da vigilância epidemiológica como no nível laboratorial, sem que nenhum vírus selvagem fosse detectado (MMWR 1994). A experiência adquirida com a rede de laboratório de poliovírus veio contribuir em muitos países e em regiões, como modelo para a vigilância de outras doenças infecciosas de importância para a Saúde Pública tais como rubéola e sarampo (MMWR 2000a).

Embora desde o momento da eliminação dos poliovírus selvagens das Américas, o diagnóstico laboratorial tenha permanecido basicamente o mesmo, técnicas moleculares mais modernas, tais como sequenciamento nucleotídico dos poliovírus isolados, têm sido introduzidas com uma consequente redução nos prazos de liberação dos resultados de 28 dias para 14 dias (WHO 2004a).

Atualmente, considerando todo o sucesso da experiência adquirida com a rede de laboratório de poliovírus, existe uma imensa preocupação, dentro do programa global de erradicação, quanto à contenção dos poliovírus selvagens isolados em diferentes laboratórios ou dos poliovírus potencialmente presentes em amostras biológicas (WHO 2004b).

## 1.5. Poliovírus Derivado Vacinal (PVDV)

Um problema não conhecido na época do desenvolvimento da vacina VOP diz respeito à plasticidade do genoma dos poliovírus, bem como de outros vírus RNA. Análises genômicas detalhadas evidenciaram que o processo de atenuação das amostras de poliovírus selvagens foi devido a um pequeno número de mutações que ocorreram ao longo do genoma desses vírus (Minor 1993).

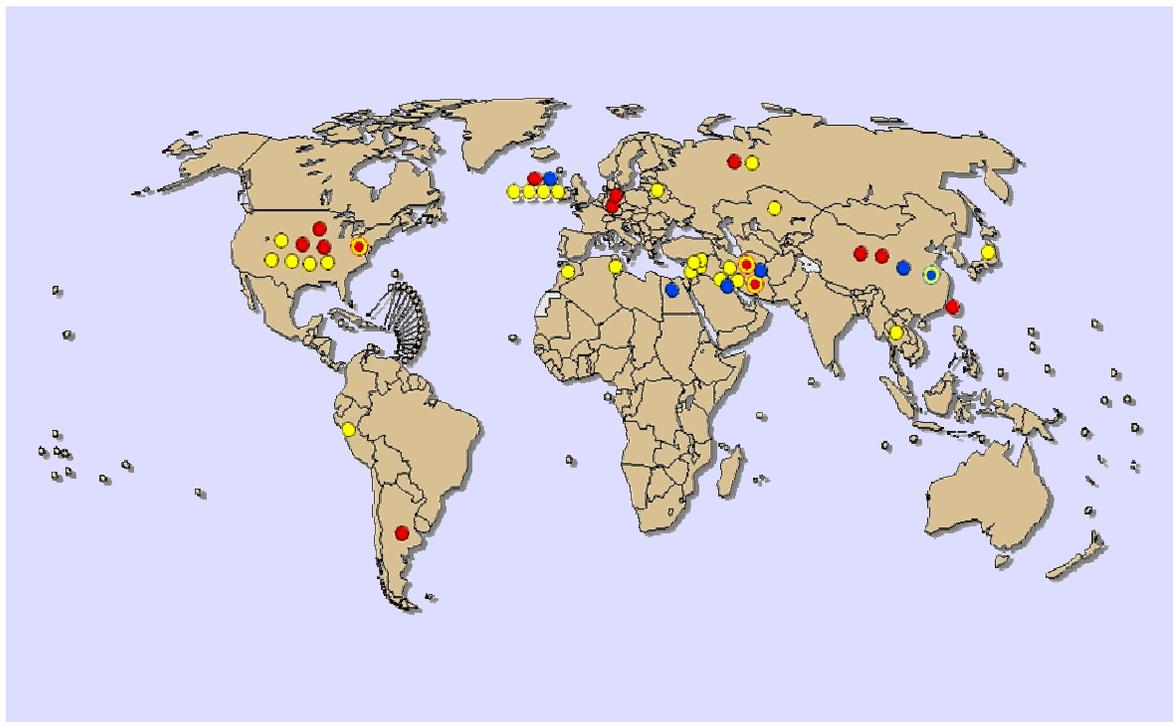
Como citado anteriormente, após administrados oralmente, os poliovírus vacinais replicam-se no intestino humano e, durante este processo, podem sofrer mutações. Como consequência, subpopulações virais contendo modificações fenotípicas emergem, as quais podem possuir características de neurovirulência semelhantes às apresentadas pelos poliovírus selvagens. Estas amostras, excretadas por cerca de 30% dos indivíduos vacinados, podem infectar indivíduos não vacinados que entrem em contato com os primovacinados.

Algumas amostras mais divergentes apresentam mais de 1% de diferença nucleotídica em relação à amostra Sabin correspondente, o que é indicativo de prolongada replicação dos vírus vacinais. Estas amostras são denominadas, assim, de poliovírus derivados vacinais (PVDV) (Kew et al. 2002). No início dos anos 1980, Nottay e colaboradores realizaram estudos avaliando a taxa de mutação dos poliovírus na natureza. Diversos fatores combinados determinam a taxa de evolução do vírus. Esses fatores incluem a taxa de erro da replicase, a quantidade de partículas virais e a taxa de replicação, a intensidade das pressões seletivas e a existência de mecanismos de troca genética (Kew et al. 1995). É estimado que os poliovírus se repliquem a uma taxa de mutação de, aproximadamente, ~ 1% por ano de circulação (Jorba et al. 2008).

Três categorias de PVDV já foram identificadas e bastante estudadas: na primeira categoria estão incluídas as amostras de poliovírus vacinais isoladas de pacientes com problemas na produção de anticorpos (geralmente imunodeficiência comum variada ou agamaglobulinemia ligada ao cromossoma X) chamada de iPVDV (Kew et al. 1998, 2005). Algumas amostras de iPVDV são bastante divergentes (~10% de diferença nos nucleotídeos do gene que codifica a proteína VP1 em comparação com as amostras Sabin padrão) sugerindo que a infecção crônica pelos poliovírus persistiu por 10 anos ou mais (Kew et al. 1998). Até agora todos os relatos de infecções persistentes por iPVDV foram feitos por países apresentando níveis altos ou intermediários de desenvolvimento, onde as taxas de cobertura vacinal são elevadas. Não existe, até o momento, nenhuma evidência de cadeias de transmissão de iPVDV nas comunidades, apenas infecções prolongadas restritas a um único indivíduo. De 1962 a 2004, 22 excretadores crônicos foram identificados pela OMS. Nesta

ocasião, nove dos 22 casos evoluíram para o óbito (Kew et al. 2005). Dados posteriores indicam a existência de, aproximadamente, 40 excretores crônicos em diferentes países (WHO 2008, 2009; MMWR 2009) (Figura 1.9). Embora a maioria dos excretores iPVDV apresente quadro paralítico, uma proporção substancial (30%) não mostram qualquer sinal de paralisia. Mais da metade dos pacientes que sobreviveram e a maioria dos que permanecem vivos interromperam a excreção do iPVDV (Kew et al. 2005).

**FIGURA 1.9: Distribuição geográfica global dos excretores crônicos de poliovírus (i-PVDV)**



Esther de Gourville 14<sup>th</sup> Consultation 2008 WHO/HQ

Fonte : MMWR, 2009

● Sorotipo 1

● Sorotipo 2

● Sorotipo 3

Localização de indivíduos excretando poliovírus derivado vacinal de imunodeficiente (i-PVDV) de 1961 a 2009. Cada círculo representa um indivíduo e as cores vermelha, amarela e azul indicam o sorotipo sendo i-PVDV tipo 1, 2 e 3 respectivamente. Fonte: MMWR 2009.

A segunda categoria de vírus vacinal derivado é denominada “Poliovírus Derivado Vacinal Circulante” (cPVDV), capazes de extensa circulação nas comunidades e causadores de surtos de poliomielite semelhantes àqueles causados pelos poliovírus selvagens.

Se a taxa de cobertura vacinal em dada comunidade for elevada (>90%) as amostras virais oriundas da vacina serão naturalmente neutralizadas pelos indivíduos imunizados. Entretanto se a imunização for incompleta, com taxas de cobertura abaixo do esperado, um

poliovírus vacinal pode se espalhar e infectar sequencialmente indivíduos não imunes, acumulando mutações e reversões genômicas durante sua replicação e aumentando a chance de que algum indivíduo venha contrair a poliomielite parálitica, o que pode ser o início de um surto em comunidades sem cobertura vacinal (Kew et al. 2002).

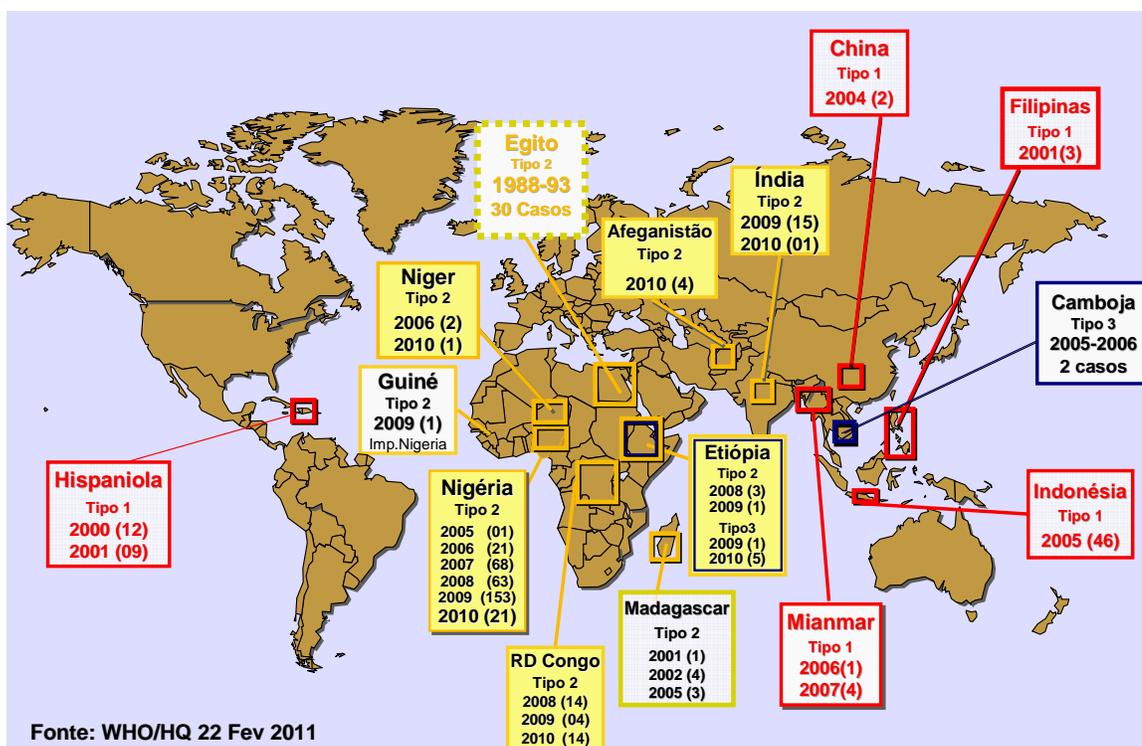
Os cPVDV's possuem as mesmas propriedades biológicas de um poliovírus selvagem tais como, a capacidade de disseminação rápida pessoa a pessoa e neurovirulência. Para o programa de erradicação, a presença de um cPVDV ou de um iPVDV em dada comunidade deve ser considerada da mesma forma que um poliovírus selvagem e as ações de saúde pública pertinentes devem ser rapidamente levadas a efeito (Kew et al. 2005).

Vários surtos de poliomielite parálitica causada por cPVDV foram descritos (Figura 1.10) em 2000-2001 na ilha de Espanhola, formada por Haiti e República Dominicana (Kew et al. 2002), nas Filipinas em 2001 e em Madagascar em 2003 (MMWR 2003). De 2004 até 2010 outros 13 países registraram surtos causados por cPVDV sendo que o poliovírus do tipo 2 tem sido o mais frequentemente relatado. O principal surto, tanto em número de casos quanto em duração, foi o registrado na Nigéria. Esse surto iniciou em 2005 e ainda não foi controlado, apesar de grandes esforços e investimentos, totalizando, até o momento, mais de 300 casos confirmados laboratorialmente. Além da Nigéria, foram detectados surtos pelo cPVDV 2 no Afeganistão, Congo, Índia, Somália, Guiné e Niger; pelo cPVDV1, em Mianmar e Indonésia; pelo cPVDV3, no Cambódia e pelo tipos cPVDV1 e cPVDV3 na Etiópia (Kew et al. 2005, GPEI homepage). Em 2011 estão confirmados dois casos de PVDV2 com um caso na Nigéria e o outro, no Afeganistão (GPEI homepage em 25-03-2011).

Devido ao fato de estarem circulando nas comunidades com baixas coberturas vacinais, os cPVDV's frequentemente sofrem, também, recombinações intertípicas (com genomas de outros poliovírus vacinais) além de recombinações com genomas de outros enterovírus. As consequências dessas recombinações, tanto sob o ponto de vista adaptativo, evolutivo ou epidemiológico, não são ainda bem compreendidas.

Ainda que possa parecer um paradoxo, a única medida que tem se mostrado eficaz no combate e eliminação dos cPVDV's é a manutenção de taxas elevadas de cobertura vacinal com a utilização da própria vacina oral Sabin (Kew et al.2005).

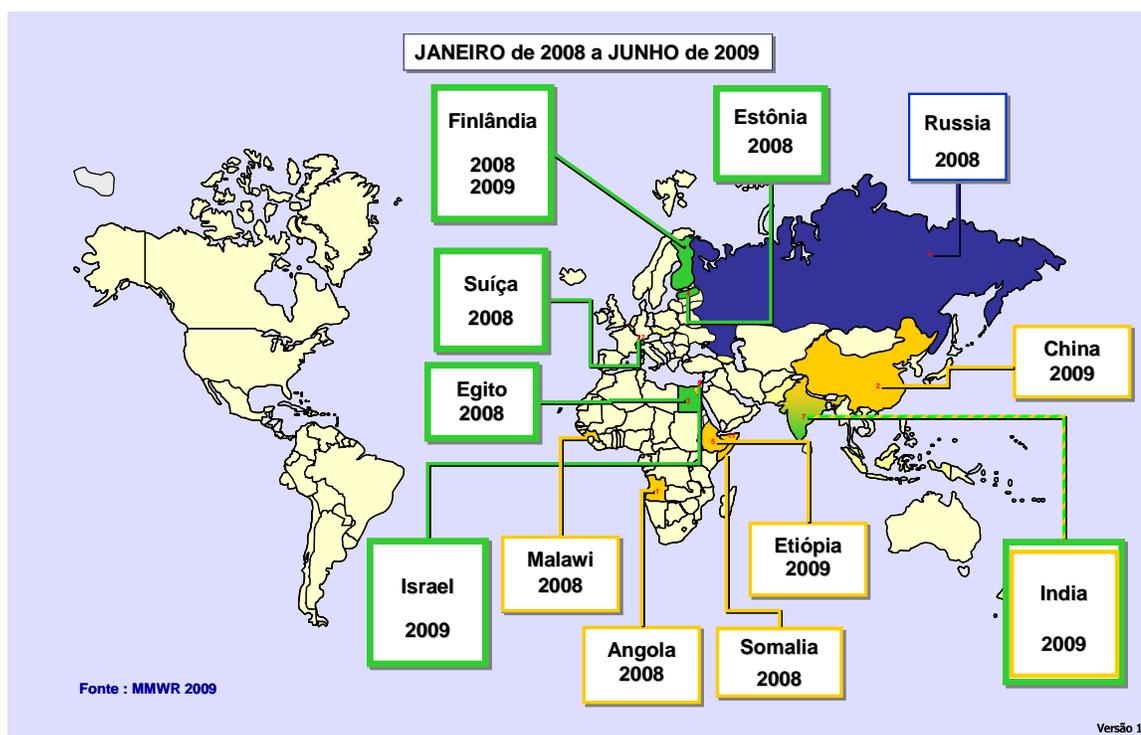
FIGURA 1.10: Distribuição geográfica dos surtos de PVDV circulantes (c-PVDV)



Legenda: Distribuição geográfica dos surtos de c-PVDV. Surtos de poliovírus derivado da vacina circulante estão associados a 2 ou mais casos de PFA. Os retângulos indicam os países, o sorotipo envolvido, o número de casos e os anos da ocorrência dos surtos. As cores das linhas externas dos retângulos estão relacionadas ao sorotipo do PVDV e o tracejamento indica um estudo retrospectivo. A cor amarelada no interior dos retângulos está relacionada aos surtos ocorridos em 2010. Não estão reportados neste mapa os casos, com menos de 10 mutações, geneticamente relacionados à vacina e os casos ambíguos. O mapa não indica linhagens diferentes do mesmo país. Mapa produzido por Eliane Costa com base nas informações do [www.globalpolioeradication.org](http://www.globalpolioeradication.org) em 01-03-2011.

A terceira categoria de poliovírus derivado da vacina é classificada como ambígua (aPVDV). Nesta categoria estão incluídos os casos em que o poliovírus foi isolado de um indivíduo imunocompetente, na ausência de um surto, ou quando o PVDV foi isolado de amostra ambiental. Vários países em que o poliovírus selvagem já foi eliminado tem apresentado relatos de identificação de aPVDV em amostras ambientais, incluindo os que utilizam a vacina inativada, como ocorrido na Finlândia (Roivainen 2010). No período de Janeiro de 2008 a junho de 2009, 11 países tiveram isolamento de aPVDV a partir de casos de PFA de indivíduos imunocompetentes e também de amostras ambientais (Figura 1.11). Até a presente data, das amostras isoladas, as identificadas de material de esgoto são as que apresentaram maior divergência (MMWR 2009).

FIGURA 1.11: Distribuição geográfica dos PVDV considerados ambíguos (aPVDV)



Legenda: Distribuição geográfica de isolamento de a-PVDV. Os retângulos indicam os países e os anos do isolamento dos a-PVDV. As linhas externas dos retângulos nas cores verde e amarela estão relacionadas à origem da amostra como ambiental e de caso de PFA respectivamente. A cor do país acompanha a cor do retângulo. A cor azul utilizada apenas na Rússia refere-se ao isolamento da amostra de uma criança saudável. As porcentagens de divergências em relação à cepa vacinal nos casos ligados a PFA variaram de 1,1 a 3,1% e de 1,1 a 15,6% em casos de amostras ambientais. **Mapa produzido por Eliane Costa com base nos dados da MMWR 2009.**

## 1.6. Importância

O mundo presenciou até hoje a erradicação de apenas uma doença que foi a varíola nos anos 1970s e se prepara para a erradicação da poliomielite. A erradicação Global da Poliomielite decidida em 1988, durante reunião na 41ª Assembléia Mundial da Saúde (WHA 1988), e prevista inicialmente para o ano 2000, foi surpreendida por situações diversas, com consequente atraso de mais de uma década na meta estabelecida, mas que, contraditoriamente, contribuíram para um ajuste no planejamento de ações mais seguras para o período de pós-erradicação.

Alguns aspectos, oriundos do conhecimento adquirido acerca da epidemiologia molecular dos poliovírus, têm sido amplamente utilizados, desde 1995, no programa de

erradicação global da poliomielite, no sentido de: i) determinar as fontes de importação de vírus; ii) rastrear as rotas de transmissão viral, iii) monitorar o progresso das ações de controle, iv) identificar os reservatórios de transmissão dos poliovírus e, v) desenvolver reagentes moleculares capazes de detectar precoce e rapidamente os poliovírus selvagens em amostras clínicas e ambientais, além de possibilitar a comprovação de que a erradicação dos poliovírus foi atingida (Kew et al. 1995).

Ocorreram atrasos e situações não previstas inicialmente, porém esses fatos contribuíram para o ajuste e planejamento de ações mais seguras para o período pós-erradicação. Nosso trabalho vem trazer aspectos virológicos retrospectivos durante um período de 12 anos, iniciados imediatamente após a certificação da Região das Américas como livre dos poliovírus selvagens autóctones, até 2007. A utilização de novas técnicas, principalmente as moleculares, permitiu identificarmos aspectos não analisados e também reanalisarmos, com maior sensibilidade, resultados anteriormente conhecidos tais como a instabilidade do poliovírus vacinal em relação a reversão da neurovirulência e eventos de recombinação com outros *Enterovirus*. Eventos de recombinação têm sido demonstrados com frequência em PV de forma natural. Indivíduos vacinados com VOP trivalente têm apresentado recombinação intertípica comprometendo os três sorotipos de PV (tipo 1, 2 e 3). Todas as informações obtidas poderão servir como apoio em decisões na fase final da erradicação global da poliomielite e também na era pós-erradicação em nosso País.

Dados oficiais da OMS indicam que, desde 2003, o número global de casos de poliomielite por ano flutua de 1.000 a 2.000, e que, entre 12 e 23 países, os casos decorrentes da importação de poliovírus selvagens têm sido registrados frequentemente a cada ano (GPEI Homepage em 28-01-11). Como Laboratório de Referência Nacional para Enterovirose para o Ministério da Saúde e Regional para a Região das Américas pela OMS o LEV tem como compromisso dar apoio ao Programa de Erradicação Global da Poliomielite com participação ativa na realização do diagnóstico laboratorial dos casos suspeitos de poliomielite. Dentro deste programa, aspectos de epidemiologia molecular têm sido amplamente utilizados e considerados de grande importância (Kew et al. 1995). O Brasil vem mantendo altas taxas de cobertura vacinal, no entanto, nem todos os 5.564 municípios, encontrados na área de 8,5 milhões de quilômetros quadrados, conseguem cobertura vacinal adequada. O país conta com grandes diversidades, de ordem geográfica, climática e sócio-econômico-cultural, que tornam os seus resultados heterogêneos e que, conseqüentemente, proporcionam uma tendência ao acúmulo gradativo de suscetíveis, fator de risco de disseminação do poliovírus selvagem, em uma ocasional reintrodução ou de poliovírus derivado da vacina (PVDV). Esta tendência justifica a necessidade das vacinações em massa, mas justifica também a vigilância

laboratorial de alto nível. Soma-se a esta justificativa o fato de o País se constituir em importante pólo turístico e comercial, hospitaleiro a outras nacionalidades, sediando, assim, um intenso fluxo receptivo e emissivo de viajantes internacionais. Cabe ressaltar que por meio de um avião comercial pode-se em 24 horas chegar, praticamente, a qualquer local do planeta. ([http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_tecnico\\_polio\\_2006\\_1.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_tecnico_polio_2006_1.pdf)). Dessa forma, a constante vigilância laboratorial em seus vários níveis (desde isolamento viral até a caracterização molecular e genotípica) é de suma importância no monitoramento da transmissão de poliovírus vacinais derivados (mutantes) e/ou poliovírus selvagens reemergentes ou importados de países endêmicos para nossas comunidades.

Nos estágios finais de erradicação em que o mundo se encontra na atualidade é de fundamental importância a continuidade e o aprimoramento das metodologias visando à vigilância laboratorial dos casos de PFA causados pelos poliovírus selvagens (em países ainda endêmicos) assim como o monitoramento dos poliovírus de origem vacinal mutados (PVDV).

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Caracterizar o genoma dos poliovírus vacinais isolados de casos de paralisia flácida aguda que ocorreram no Brasil no período de 1995 a 2007 para verificar sua estabilidade.

### **Objetivos Específicos**

1) Determinar a sequência de nucleotídeos do gene que codifica a principal proteína do capsídeo dos poliovírus (VP1) de amostras dos três sorotipos de poliovírus de origem vacinal isolados.

2) Analisar, após o sequenciamento nucleotídico, a presença de mutações que conferem o caráter neurovirulento na região 5' NC. Considerando que nesta região 5' NC estão localizadas as principais posições nt 480, 481 e 472, presentes nos PV1, PV2 e PV3, respectivamente, que estão relacionadas com a reversão à neurovirulência nas amostras Sabin, todos isolados foram analisados com o objetivo de se identificar a mutação presente no fenótipo selvagem.

3) Analisar a presença de recombinação nos genes da protease 2C e polimerase 3D em amostras de poliovírus de origem vacinal isolados.

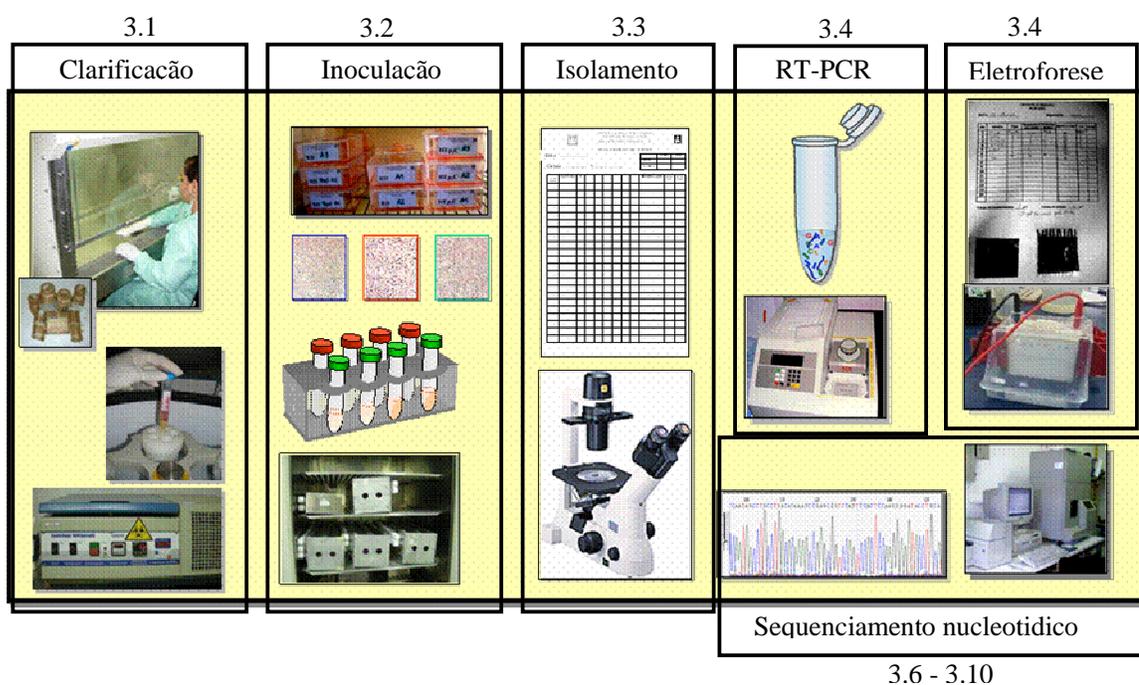
4) Comparar os resultados das análises obtidas pelo algoritmo Neighbor-joining com os da rede de haplótipos das sequências de poliovírus de origem vacinal dos três sorotipos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Amostras

No período de 1995 a 2007, quatrocentas e quinze amostras com isolamento positivo para poliovírus dos três sorotipos foram processadas no LEV do IOC, oriundas de casos de PFA que ocorreram no Brasil. A Figura 3.1 apresenta de forma esquemática algumas das etapas envolvidas no processamento das amostras de casos de PFA.

FIGURA 3.1: Fluxograma das etapas do diagnóstico laboratorial para enteroviroses

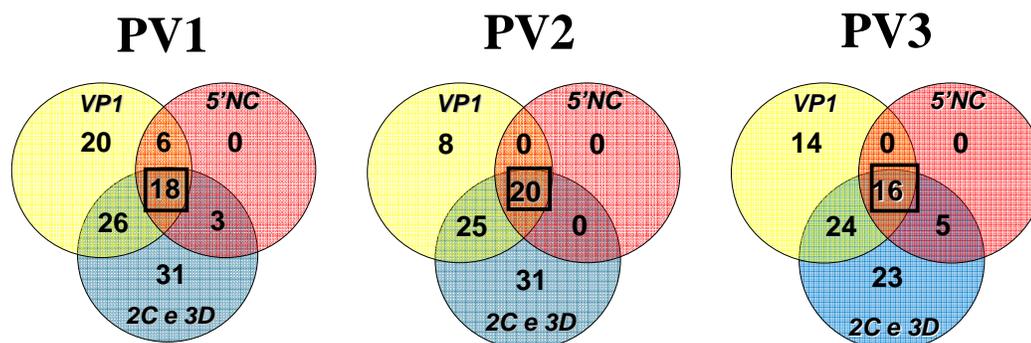


Principais etapas envolvidas no diagnóstico laboratorial dos enterovírus de casos de PFA. Cada retângulo está identificado com as etapas do processamento e os números, acima (3.1-3.4) e abaixo (3.6-3.10), estão relacionados com os itens, detalhadamente descritos, dentro do tópico “Material e Métodos”.

Das amostras de poliovírus incluídas no estudo, 146 pertenciam ao sorotipo 1 (PV1), 101 ao sorotipo 2 (PV2), 114 ao sorotipo 3 (PV3) e 54 amostras apresentaram uma mistura de sorotipos. Para o nosso estudo foram excluídas as misturas de poliovírus, pois podem ocorrer interferências nas análises dos resultados dos testes de PCR e sequenciamento nucleotídico. O armazenamento dos vírus isolados foi a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Dentro de cada um dos grupos, as

amostras foram selecionadas aleatoriamente com a realização das análises de forma combinada como indicada na Figura 3.2.

Figura 3.2. Diagrama das amostras de PV1, PV2 e PV3 em relação ao tipo de análise realizada nas diferentes regiões do genoma.



Cada região analisada nos poliovirus 1, 2 e 3 foi representada por círculos nas cores vermelha para 5'NC, amarela para VP1 e azul para 2C/3D. Os números no interior dos círculos representam o número de amostras analisadas. A interseção dos círculos indica análises em mais de uma região para a mesma amostra. O número central de cada diagrama assinalado por um quadrado preto representa as amostras de cada sorotipo que foram analisadas em todas as regiões e os resultados indicados nas tabelas 4.1, 4.2 e 4.3 para PV1, PV2 e PV3 respectivamente.

### 3.2. Cultivos Celulares

As linhagens celulares RD (rhabdomiosarcoma humano), HEp-2C (carcinoma humano epidermóide de laringe) e L20B (células L de camundongos) utilizadas foram fornecidas pelo CDC (“Center for Disease Control and Prevention”, Atlanta - USA) ao LEV. As células, em monocamadas, foram cultivadas em tubos de vidro pirex ou de poliestireno a uma concentração de, aproximadamente, 200.000 células/mL em meio essencial de Eagle Earle contendo 5% de soro fetal bovino (Life-Technologies) (WHO, 2004a). Os cultivos foram incubados a 36,5°C por 48 horas, até que apresentassem uma confluência de 90 a 100%.

### 3.3. Isolamento Viral

O isolamento viral foi realizado a partir das fezes de pacientes com quadro de PFA, de acordo com o procedimento recomendado pela OMS (WHO, 2004a). As amostras foram clarificadas e inoculadas nos tubos contendo monocamadas celulares de cada uma das

linhagens. Os tubos foram incubados a 36,5°C, observados diariamente em microscópio invertido Nikon TS 100 no período de cinco a sete dias até que apresentaram efeito citopatogênico (ECP) de 75-100%. Uma segunda passagem foi realizada em cada uma das linhagens celulares ou, em algumas situações, esta passagem foi transferida da linhagem RD para a L20B e/ou de L20B para a RD. Este procedimento detalhado encontra-se no manual de laboratórios de poliomielite (WHO 2004a).

Os tubos que apresentaram ECP característico foram estocados a -20° C ou -70° C para posterior identificação.

### **3.4. Identificação do vírus isolado por RT-PCR**

Os enterovírus isolados foram detectados pela técnica de transcrição reversa (RT-PCR) em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems). O par de iniciadores utilizados nas reações (EVR e EVF) está localizado na região terminal 5' NC (não codificante) do RNA, uma região conservada e comum ao genoma de todos os enterovírus humanos conhecidos. As sequências dos “primers” encontram-se no item 3.11, Tabela 3.1. O tamanho esperado do fragmento amplificado é de 153 pb. A confirmação do vírus isolado como pertencente ao gênero *Enterovirus* foi seguida por outra reação de RT-PCR que visa à identificação de poliovírus utilizando os “primers” PAN-PV (R e F), com tamanho do fragmento esperado de 79 pb, também apresentados na Tabela 3.1. Esta reação identifica os três sorotipos de poliovírus tanto os fenótipos selvagens como os vacinais. Após a confirmação do vírus como um poliovírus, foram realizadas mais quatro reações de RT-PCR para identificação do sorotipo e de sua caracterização intratípica. Esta última reação, que se trata de um multiplex PCR, tem como finalidade a caracterização da cepa como de origem selvagem ou vacinal. Os produtos das reações de RT-PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida a 10%. Segundo o protocolo internacional para diagnóstico dos poliovírus após a caracterização intratípica é recomendado o sequenciamento nucleotídico do gene que codifica a principal proteína do capsídeo, VP1. Esta análise permitiu a avaliação do número de mutações frente ao genoma original do vírus vacinal (WHO 2004a).

### **3.5. Extração do RNA**

Os RNAs virais foram extraídos com o uso do produto Trizol LS (Life-Technologies), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O método baseia-se na

desnaturação e precipitação das proteínas contidas no meio, pelo fenol-clorofórmio, em presença de sais de guanidinium (poderoso inibidor da enzima RNase).

### **3.6. Construção do c-DNA**

Ao RNA extraído e ressuspenso em 9 µl de H<sub>2</sub>O, 100 pmoles de Oligo dT (Promega) foram adicionados e a mistura incubada a 70°C por 10 minutos em termociclador (9700 Perkin Elmer). O tubo foi transferido para um banho de gelo e, em seguida, centrifugado por 30 seg. Foram acrescentados: 4µl do tampão de cDNA 5X concentrado, 2µl de DTT 0,1M, 3µl de uma mistura de dNTP's a 10mM (100mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato – dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies), 20U de inibidor de RNase (RNAsin, Promega) e e incubados a 42°C por 2 minutos. Em seguida, a mistura foi acrescida de 50U de transcriptase reversa (Super Script II, Life Technologies), resultando em um volume final de 20µl. A reação de RT foi realizada a 42° C por 50 minutos no termociclador e o cDNA produzido foi estocado à -20°C.

### **3.7. Reações de RT-PCR**

#### **3.7.1 – Amplificação da região 5'NC do genoma dos poliovírus**

A amplificação da região 5'NC foi realizada utilizando-se 3 µl do cDNA obtido como indicado no item 3.6, tampão de PCR 10X concentrado [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, 1,5 ml de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM], 50 pmol do “primer” antissenso (EVR), 50 pmol do “primer” senso (S11S), 10 mM de mistura de cada dNTP's (Life - Technologies), 2,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e o volume levado a 50 µL com água deionizada autoclavada. A mistura foi submetida a 30 ciclos de 95 °C por um minuto, 55 °C por 40 segundos e 70 °C por um minuto e um período final de extensão de 5 minutos a 72 °C. O fragmento produzido por esta reação é de 700 pb e os produtos, após eletroforese em géis de agarose 1% em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE), são visualizados em transiluminador (UV).

#### **3.7.2 – Amplificação do gene da proteína VP1 do genoma dos poliovírus**

A amplificação do gene que codifica a proteína de capsídeo VP1 foi realizada utilizando-se 3 µl dos cDNA obtidos, tampão de PCR 10X concentrado [200 mM Tris-HCl

(pH 8.4), 500 mM KCl, 1,5 mL de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM], 50 pmoles de cada “primer” (Q8/Y7) complementares às regiões (VP3 e 2A) que flanqueiam o gene da proteína, 10 mM de mistura de cada dNTP's (Life - Technologies), 2,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e, completando-se o volume para 50 µl com água deionizada autoclavada. A mistura foi submetida a 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 45 segundos e 60 °C por 2 minutos, finalizando-se com uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. A amplificação do fragmento de 1.100 pb foi avaliada em gel de agarose 1% preparados com tampão TAE com visualização com brometo de etídeo a 1mg/ml. Este procedimento foi realizado para as 177 amostras de poliovírus vacinais analisadas. As amostras, após a corrida eletroforética a 120 V por 40 minutos tiveram seus produtos visualizados em transiluminador de ultravioleta e os resultados documentados sob a forma de fotografia com filme Polaroid 667 ou através de do equipamento da BIORAD GEL DOC XR.

### **3.7.3 – Amplificação das regiões 2C e 3D**

Foram realizadas reações da PCR (duplex) utilizando-se dois pares de “primers” específicos para cada um dos sorotipos, visando o reconhecimento de regiões de recombinação nas regiões de proteínas não estruturais 2C e 3D do genoma de 222 amostras de poliovírus dos três sorotipos (Kilpatrick et al. 2004).

Para cada reação de PCR foram utilizados 0,5 µL das amostras de cDNA obtidos (como descrito no item 3.6), tampão de PCR 10X concentrado [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, 1,5 mL de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM], 10 pmol de cada “primer” (REC-primer 1, 2 e 3), 10 mM de mistura de dNTP's (Life - Technologies), 2,5U de Taq DNA polimerase e, o volume levado a 25 µL com água deionizada autoclavada. A mistura foi submetida a 32 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 50 °C por um minuto e 65 °C, finalizando-se com uma extensão final a 72 °C por cinco minutos. Estes nucleotídeos ligam-se, especificamente, a segmentos das porções 2C e 3D do RNA viral amplificando segmentos de 199 pb e 226 pb (S1-REC), 189 pb e 225 pb (S2-REC) e 199 pb e 228 pb (S3-REC) respectivamente.

A amplificação dos fragmentos foi avaliada em gel de poliacrilamida a 10% preparado com tampão Tris-borato-EDTA (TBE), utilizando solução de brometo de etídeo a 1mg/mL para visualização dos produtos. Para a visualização dos produtos da reação de RT-PCR, 4 µL do tampão da amostra 6X concentrado (Gel Loading Buffer) foram adicionados a 10 µL do produto amplificado.

A eletroforese foi realizada a uma corrente de 120 V por 40 minutos. Os fragmentos foram visualizados em transiluminador de ultravioleta, sendo os resultados documentados sob

a forma de fotografia com filme Polaroid 667 ou através do equipamento da BIORAD GEL DOC XR.

### **3.8 – Purificação dos produtos de RT-PCR**

Na purificação dos produtos de amplificação foi utilizado o kit comercial QIAGEN (QIAquick Gel Extraction Kit), segundo o protocolo do fabricante. Os fragmentos obtidos na RT-PCR para o gene da proteína VP1 e da região 5'NC foram visualizados em gel de agarose 1%. As bandas de interesse com 1.100 pb para a VP1 e 700 pb para a 5'NC foram excisadas dos géis com ajuda de um bisturi, pesadas e transferidas para tubos de 1,5 mL. O tampão de solubilização (QG) foi adicionado a cada tubo na proporção de 300µL/100mg de gel e incubados por 10 minutos a 50 °C em termobloco, com agitação a intervalos de 3 minutos, garantindo a total solubilização do gel. O pH inferior a 7,5 é fator importante sendo garantido através de um indicador no próprio kit. A mistura foi então colocada na coluna disposta sobre os tubos coletores de 2,0 mL, centrifugados por um minuto a 17.900x g e o filtrado descartado. Foram adicionados mais 500 µL de tampão QG para remover todo o resíduo da agarose, seguido de centrifugação por um minuto a 17.900x g e o filtrado descartado. O procedimento baseia-se na capacidade de ligação do DNA na coluna, pela qual a amostra passa durante o procedimento de purificação. Uma etapa de lavagem foi realizada com a adição de 750 µL de tampão de lavagem (PE) a coluna, seguida de centrifugação a 17.900x g por um minuto e o filtrado descartado. Visando a garantir a remoção de todo resíduo de etanol do tampão PE, a coluna foi novamente centrifugada e a mesma colocada em um tubo de 1,5 mL estéril e identificado. A eluição do DNA purificado com tampão de eluição (TE) foi realizada em 2 etapas: adição de 50 µL seguida de centrifugação a 17.900 x g por um minuto e em seguida mais 30µL do TE, ficando o sistema (tubo-coluna) incubado por um minuto à temperatura ambiente e novamente centrifugado a 17.900 x g por mais um minuto. A coluna foi descartada e o filtrado foi estocado a -20 ° C.

### **3.9 – Avaliação quantitativa dos produtos de PCR purificados**

Uma alíquota de 4 µl do DNA purificado foi misturada com 2 µL de corante (dye Loading Buffer 6X) e 6 µL de água autoclavada deionizada e a mistura aplicada em gel de agarose 1%, preparado com tampão TAE, contendo brometo de etídeo (10 mg/mL). A intensidade da banda de cada produto foi avaliada por comparação com um padrão de marcador de massa (Low Mass DNA Ladder – Life Technologies) indicando a concentração

aproximada de DNA contida em cada amostra. A corrida eletroforética foi realizada a 120 V por 40 minutos, o gel foi levado ao transiluminador de ultravioleta e fotografado com filme Polaroid 667 ou através do equipamento da BIORAD GEL DOC XR.

### **3.10 – Sequenciamento dos produtos de RT-PCR**

Para esta reação, utilizamos o kit “ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (PE Applied Biosystems), baseado na marcação fluorescente dos didesoxinucleotídeo incorporados às cadeias de DNA, de tamanhos variáveis formados durante os ciclos de desnaturação, anelamento e extensão.

O volume final de cada reação foi de 20µL, contendo os seguintes componentes: DNA purificado a ser sequenciado (na concentração de 120-200 ng); 10 pmol de “primer” senso Y7 e do de “primer” reverso Q8 (utilizados separadamente) para a proteína VP1; 5 pmol de “primer” reverso EVR para a região 5’NC; 6,4 µL da mistura pronta de marcação terminal Big Dye terminator 5X sequencing buffer (Taq DNA Polimerase, dNTP’s, ddNTP’s marcados, MgCl<sub>2</sub> e Tris-HCl pH 9,0) e 1,6 µL de tampão “Big Dye terminator v3.1 cycle sequencing” fornecido pelo kit. O protocolo foi seguido, segundo o fabricante e a reação foi processada em um termociclador 9700 da Perkin Elmer sob as seguintes condições: 30 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 42 °C por 20 segundos e 60 °C por um minuto.

### **3.11 – Purificação dos produtos de extensão**

O método utilizado para purificação dos produtos de extensão obtidos na reação de “cycle-sequencing” foi precipitação com etanol (Merck, Germany). Os produtos foram transferidos para tubos de 1,5 mL contendo 20 µl de água estéril e 60 µl de isopropanol absoluto (Merck, Germany), centrifugados rapidamente e deixados em repouso por 15 minutos para a precipitação do produto ao abrigo da luz. A etapa seguinte de centrifugação por 20 minutos foi realizada sob refrigeração a 17.900x g com o descarte do sobrenadante e com o acréscimo de 250 µl de isopropanol a 75%. O tubo foi vigorosamente homogeneizado com agitador automático por alguns segundos, centrifugado novamente por 5 minutos a 17900x g e o sobrenadante descartado. Os produtos purificados permaneceram no tubo e foram desidratados sob pressão negativa em aparelho Speed Vac SVC 100 (Savant Instruments) para posterior análise.

### **3.12 – Sequências obtidas nas reações de “cycle sequencing”**

As amostras desidratadas foram ressuspensas em 20 µL de tampão (“Template Supression Reagent” – PE Applied Biosystems) e aquecidas em termobloco a 95 °C por 3 minutos para desnaturação, evitando a formação de estruturas secundárias. Após esta etapa as amostras foram imediatamente colocadas em banho de gelo até o momento da análise, sempre ao abrigo da luz. As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas em sequenciador automático “ABI Prism 310 Genetic Analyser”, com a geração de eletroferogramas característicos.

#### **3.12.1. Edição das sequências**

Quando necessário, as sequências foram editadas e alinhadas utilizando o programa BioEdit versão 5.0.9 (Hall 1999). Após o sequenciamento das amostras, realizado nos dois sentidos, com um “overlap” (sobreposição) na parte central do gene, as sequências (contigs) montadas com o auxílio do programa DNASTAR e editadas, quando necessário, alinhadas com o programa Bioedit e comparadas com a cepa vacinal Sabin.

#### **3.12.2. Construção das árvores filogenéticas**

As árvores filogenéticas foram construídas com a utilização do programa Mega v.4.0 (Tamura et al. 2007) pelo algoritmo de agrupamentos de vizinhos (Neighbor-Joining, NJ) e a probabilidade dos ramos internos foi de 1.000 réplicas de “bootstrap”. O modelo de substituição de nucleotídeos utilizado foi Kimura 2-parâmetros com variação das taxas ao longo dos sítios, seguindo uma distribuição Gamma (K80+G) conforme indicado pelo programa Modeltest (Posada & Crandall 1998). A análise foi realizada com as 70 amostras sequenciadas de poliovírus 1, 53 de poliovírus 2 e 54 de poliovírus 3 acrescidas, respectivamente, das sequências de Sabin 1, Sabin 2 e Sabin 3 obtidas no Genbank com os seguintes números de acesso: AY184219 (Sabin 1), AY184220 (Sabin 2) e AY84221 (Sabin 3), sem a inserção dos grupos externos.

#### **3.12.3. Rede de Haplótipos**

Um “software” (programa de computador) que estima relações genealógicas no nível populacional chamado TCS é o responsável pela montagem da rede de haplótipos (Clement et al. 2000). O arquivo de entrada com as sequências pode estar em formato NEXUS ou PHYLIP e o programa gera, como saída, um arquivo de relatório e um arquivo contendo a rede que podem ser visualizados e editados em qualquer programa de edição de grafos. O

programa TCS v.1.21 foi utilizado para gerar redes de haplótipos dos três sorotipos de poliovírus a partir do sequenciamento do gene que codifica a VP1. Um programa yEd v.3.6.1.1 (yWorks GmbH) para a edição gráfica dos grafos foi utilizado. Algumas conexões foram removidas manualmente, sem qualquer prejuízo para análise proposta, para facilitar a visualização, seguindo a hipótese de que a evolução das sequências analisadas ocorre no sentido da amostra vacinal para a selvagem. Esse princípio foi adotado uma vez que as amostras foram isoladas a partir de casos de PFA e também pela ausência de circulação do vírus selvagem no Brasil.

Nessa análise consideramos como haplótipo uma sequência única do gene e qualquer sequência que apresente alguma mutação em relação às demais será considerada como outro haplótipo. Todas as amostras foram comparadas e as iguais foram posteriormente agrupadas, determinando-se assim o número de grupos, ou de haplótipos, presentes no conjunto de sequências analisadas. A quantidade de amostras em cada haplótipo foi levada em conta para calcular o ponto central da rede. O programa então comparou os diferentes haplótipos e foi possível construir uma matriz de distâncias. Pelo cálculo da probabilidade de parcimônia, as distâncias (número de mutações) que tiverem uma probabilidade menor que 95% foram eliminadas e desta forma foi possível estabelecer o número máximo de conexões entre os grupos. A partir destas análises, foi possível gerar um grafo, denominado rede, no qual os nós são os haplótipos e as arestas, que fazem a ligação entre os nós, representam as mutações na sequência de nucleotídeos que cada haplótipo apresenta em relação aos vizinhos.

### **3.13 – Oligonucleotídeos utilizados na reação de RT-PCR, PCR e sequenciamento nucleotídico**

Os oligonucleotídeos utilizados tanto nas reações de PCR quanto nas de “Cycle-sequencing” estão listados no Quadro 3.1.

**QUADRO 3.1: Oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR, PCR e de sequenciamento nucleotídico.**

“Primer”	Sentido	Sequência	Posição	Região
<b>EVF</b>	<sup>a</sup> F	5'-CTC CGG CCC CTG AAT GCG GCT A-3'	445-466	5'NC
<b>EVR</b>	<sup>b</sup> R	5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC C-3'	599-581	5'NC
<b>S11S</b>	F	5'-TTA AAA CAG CTC TGG GGT TG-3'	01-20	5'NC
<b>Pan PV</b>	<sup>c</sup> R	5'-TTI AII GCR TGI CCR TTR TT-3'	2934-2915	VP1
<b>Pan PV</b>	<sup>c</sup> F	5'-CIT AIT CIM GIT TYG AYA TG-3' <sup>c</sup>	2857-2876	VP1
<b>Y7</b>	F	5'-TTT GTG TCA GCG TGT AAT GAC-3'	2402-2422	VP3
<b>Q8</b>	<sup>c</sup> R	5'-ACY AAG AGG TCT CTA TTC CAC-3'	3507-3487	2A
<b>S1-REC</b>				
<b>281</b>	F	5'-TGT AAC AAA ACT TAG ACA AC-3'	4284-4303	2C
<b>321</b>	R	5'-TAT GTA GTT GTT AAT GGT ATG-3'	4482-4462	
<b>287</b>	F	5'-TAA GGA AAT GCA AAA ACT GC-3'	6423-6442	3D
<b>288</b>	R	5'-ATC GCA CCC TAC TGC TGA-3'	6648-6631	
<b>S2-REC</b>				
<b>283</b>	F	5'-CAA ATT CAT TAG TTG GTT GC-3'	4224-4243	2C
<b>284</b>	R	5'-TGG ATA GAT AGC CAC CGC-3'	4412-4395	
<b>300</b>	F	5'-AGG AAA TGC GGA GAC TCT TA-3'	6425-6444	3D
<b>302</b>	R	5'-GGA TCA CAA CCA ACT GCA CT-3'	6649-6630	
<b>S3-REC</b>				
<b>320</b>	F	5'-TGT AAC CAA ATT GAA ACA GT-3'	4284-4303	2C
<b>322</b>	R	5'-TAT GTA ATT ATT AAT GGT GTG-3'	4482-4462	
<b>319</b>	F	5'-CAA AGA AAT GCA AAG ACT TT-3'	6423-6442	3D
<b>318</b>	R	5'-GGA TCG CAT CCA ACT GCA CT-3'	6650-6631	

<sup>a</sup> “primer” sentido senso

<sup>b</sup> “primer” no sentido reverso

<sup>c</sup> “primers” degenerados: M = A/C; R = A/G; Y = C/T; I = Inosine

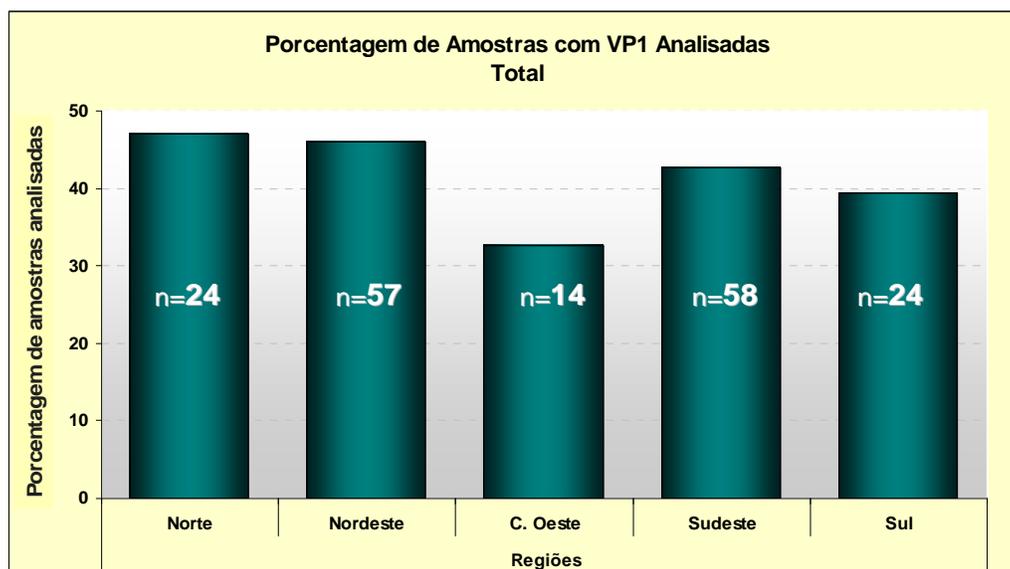
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise genômica dos poliovírus vacinais

Durante o período de 1995 a 2007 o LEV processou amostras de fezes de pacientes com diagnóstico de PFA das regiões Nordeste, Centro-oeste, Sudeste e Sul. A região Norte possui o Instituto Evandro Chagas que atende a esta região como laboratório de referência regional do Ministério da Saúde (MS). Amostras, com isolamento positivo para poliovírus, foram enviadas ao LEV para que pudessem ser submetidas à análise molecular para a caracterização intratípica (RT-PCR) e ao sequenciamento nucleotídico. Deste modo, nossa amostragem abrange todas as regiões do Brasil, assim como de todos os anos do intervalo de 1995 a 2007 totalizando 415 poliovírus isolados ou processados com 146 pertencente ao sorotipo 1; 101, ao sorotipo 2; 114, ao sorotipo 3 e 54 contendo uma mistura dos sorotipos. Para o nosso estudo foram retiradas as misturas de poliovírus, pois a análise da região de VP1, 5'NC como da região de 2C e 3D, poderia sofrer interferências que dificultariam ou inviabilizariam a interpretação dos resultados obtidos.

Dentro de cada um dos grupos, as amostras foram selecionadas aleatoriamente, e as análises foram realizadas de forma combinada como é demonstrado na Figura 4.1. Nos três sorotipos, um conjunto de 25 a 38% das amostras analisadas na região de VP1 foi também analisado em outras três regiões e seus resultados são apresentados nas Tabelas 4.1, 4.2 e 4.3. Todas as regiões do Brasil foram representadas assim como todos os períodos.

FIGURA 4.1: Distribuição das 177 amostras de poliovírus analisadas por região geográfica do Brasil no período de 1995 a 2007 para a região de VP1.



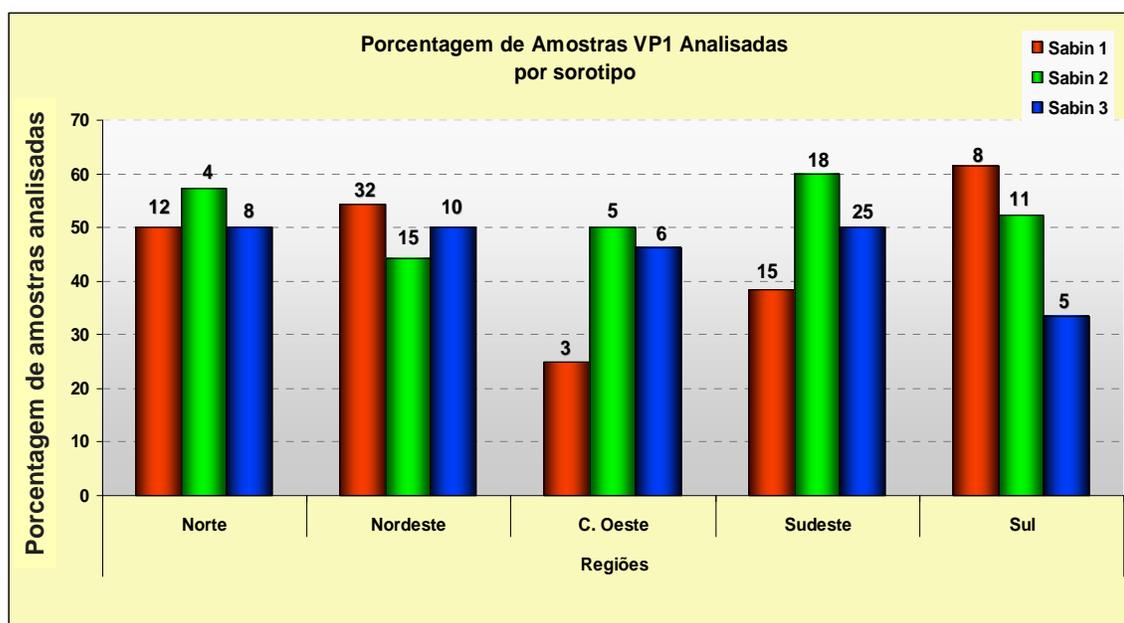
O gráfico apresenta a porcentagem de amostras de poliovírus analisadas em VP1 divididas por regiões geográficas. O **n** representa o número de amostras em cada região do Brasil.

#### 4.1.1. Análise nucleotídica do gene VP1 nos três sorotipos de poliovírus

Das 361 amostras, em que apenas um sorotipo de poliovírus (PV) foi isolado (146 amostras de PV1, 101 de PV2 e 114 de PV3), foram selecionadas, aleatoriamente, 177 amostras, cuja distribuição por região geográfica está representada na Figura 4.1. A distribuição destas 177 amostras foi de 70 amostras constituídas pelo PV1, 53 pelo PV2 e 54 pelo PV3.

Com o objetivo de aumentar o título viral, as 177 amostras foram reinoculadas nos cultivos celulares RD, HEp2 C e/ou L20B em que foram originalmente isoladas. A presença do ECP total (4+) característico dos enterovírus foi observado em até 48 horas, após a reinoculação. As amostras passaram pelas etapas de extração, síntese do cDNA, PCR, corrida eletroforética, purificação e quantificação do produto da reação da PCR, reação de sequenciamento, purificação e sequenciamento nucleotídico, conforme descrito em material e métodos. A Figura 4.2 indica a porcentagem e o número de amostras analisadas por sorotipo em cada uma das regiões.

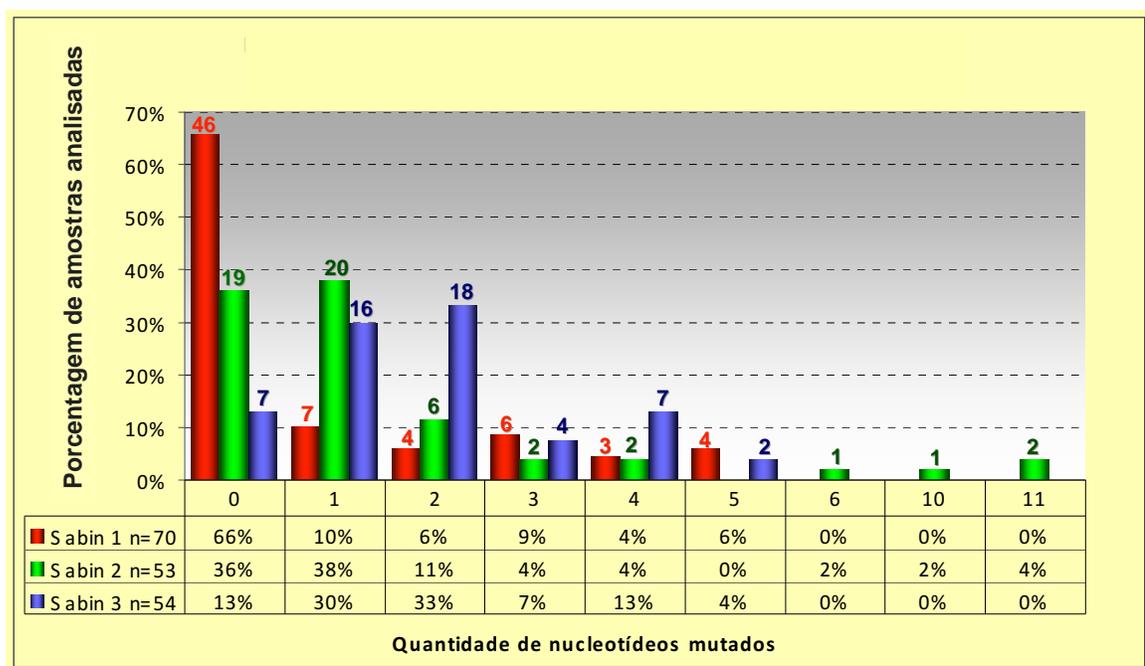
**FIGURA 4.2: Distribuição das amostras de poliovirus vacinais separadas por sorotipo e analisadas na região de VP1 em relação às regiões do Brasil de 1995 a 2007.**



O gráfico apresenta a porcentagem de amostras de poliovírus 1, 2 e 3 analisadas em VP1 divididas por regiões geográficas. O número no alto da barra representa a quantidade de amostras em cada sorotipo selecionada para o estudo.

A análise do gene da VP1 nas 70 amostras de PV1 demonstrou que a maioria dos isolados (66%) apresenta uma identidade de 100% em relação à cepa de referência Sabin 1. O maior número de mutações encontrado nos 906 nucleotídeos que compõe a VP1 foi de cinco nucleotídeos. Para o sorotipo 2, das 53 amostras analisadas, 36% apresentaram 100% de identidade com a cepa de referência Sabin 2 e o número máximo de mutações, em 903 nucleotídeos, foi de 11 nucleotídeos. Já o sorotipo 3 apresentou o menor número de sequências com identidade de 100% em relação à cepa de referência Sabin 3, com apenas 13%. Na maioria das sequências (63%), uma ou duas mutações puderam ser identificadas com o número máximo de cinco mutações nos 900 nucleotídeos da VP1. A Figura 4.3 apresenta a porcentagem de amostras de cada sorotipo distribuída pelo número de mutações de nucleotídeos na VP1.

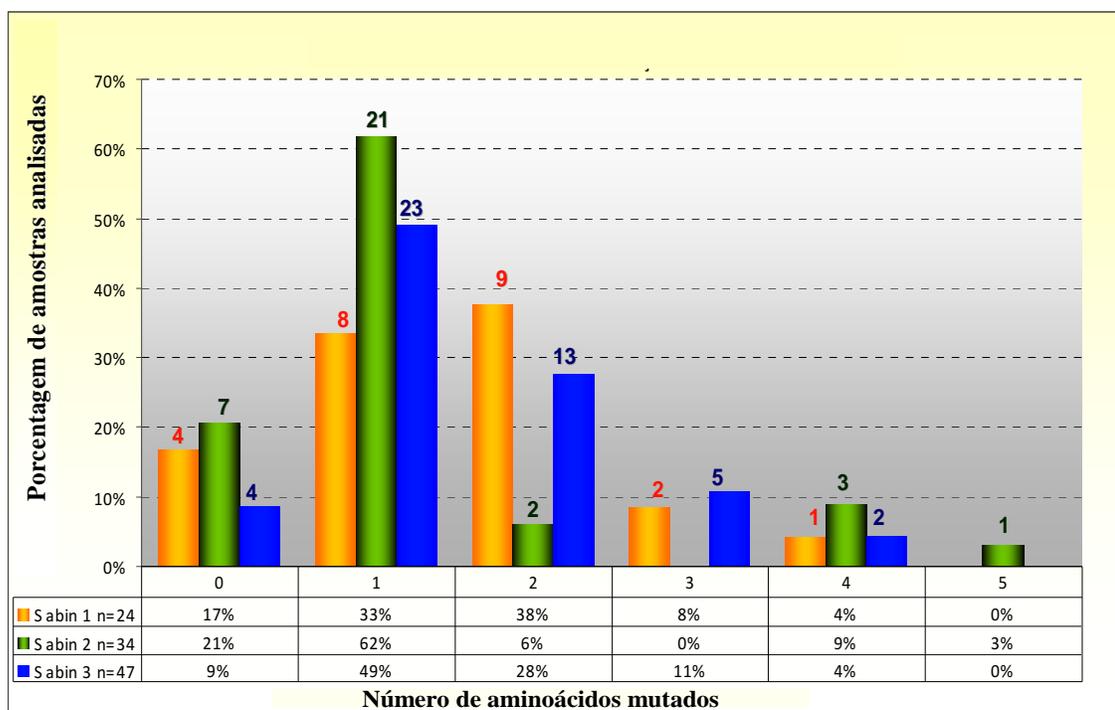
**FIGURA 4.3: Distribuição do número de mutações na região de VP1 para cada um dos sorotipos de poliovírus.**



O gráfico indica a porcentagem de amostras de poliovírus 1, 2 e 3 analisadas quanto à identidade nucleotídica em relação às cepas vacinais de referência para cada um dos sorotipos. O eixo X indica o número de mutações no gene que codifica a VP1. A Tabela apresenta o número total de amostras analisadas (n) em cada sorotipo e a porcentagem de amostras apresentando mutações nucleotídicas. O número no alto da barra representa a quantidade de amostras que apresentaram o mesmo número de mutações.

Com a finalização da análise das amostras foi possível verificar o número de mutações relacionadas a substituições sinônimas e não sinônimas. Para essa análise foram excluídas todas as amostras que apresentaram 100% de identidade em relação à cepa vacinal de cada um dos sorotipos de referência. A Figura 4.4 analisa a distribuição das mutações identificadas pelo sequenciamento de VP1 para os três sorotipos de poliovírus e que estão associadas à troca de aminoácidos quando comparadas com às cepas vacinais de referência. A VP1 possui 302, 301 e 300 aa para os sorotipos 1, 2 e 3, respectivamente. A posição do resíduo e as substituições “não sinônimas” dos aa podem ser visualizadas nas redes de haplótipos (Figuras 4.6, 4.9 e 4.12) para os sorotipos 1, 2 e 3, respectivamente.

FIGURA 4.4: **Distribuição do número de mutações sinônimas e não sinônimas.**



O gráfico apresenta a porcentagem de amostras de poliovírus 1, 2 e 3 analisadas quanto a identidade de aminoácidos em relação às cepas vacinais de referência para cada um dos sorotipos. O eixo X indica o número de mutações não sinônimas em VP1. A Tabela apresenta o número de amostras com identidade nucleotídica inferior a 100% (**n**) em cada sorotipo e a porcentagem de amostra apresentando mutações não sinônimas. O número no alto da barra representa a quantidade de amostras que apresentaram o mesmo número de troca de aminoácidos.

#### **4.1.1.1. Análise de VP1 para poliovírus sorotipo 1**

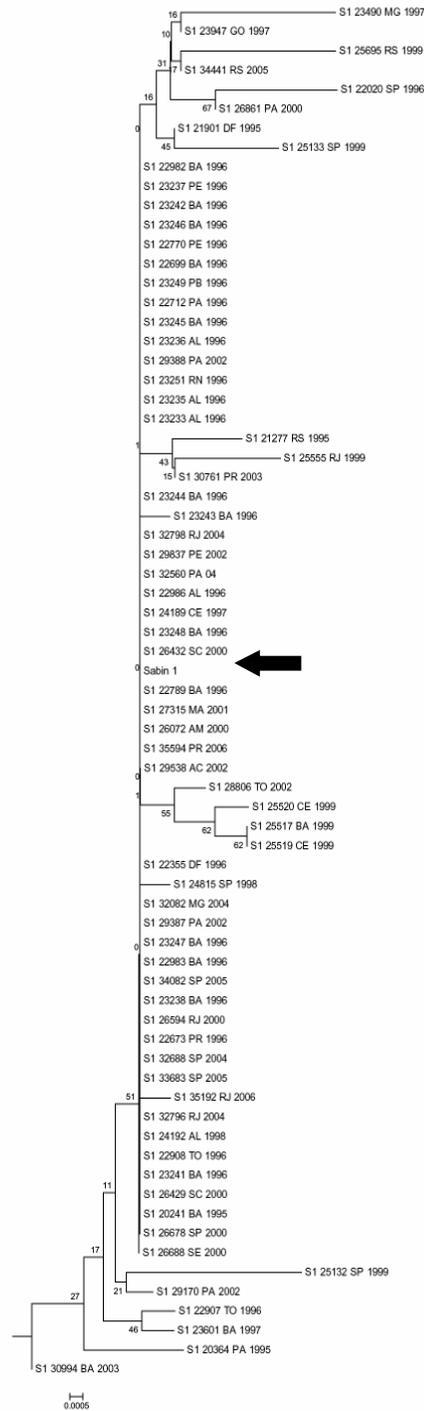
Como indicado no item 4.1.1 as 70 amostras de PV1 foram sequenciadas na VP1, alinhadas em relação à cepa de referência vacinal (Sabin 1) e os resultados apresentados na Tabela 4.1 e nas Figuras 4.5, 4.6 e 4.7.

##### **4.1.1.1.1. Análise Filogenética (PV1)**

A árvore filogenética mostrando o relacionamento entre os poliovírus do sorotipo 1 foi construída no algoritmo Neighbor-Joining utilizando o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros com distribuição Gamma (K2+G), conforme descrição no item material e métodos. O valor de gamma utilizado para esta árvore foi 0,0172 a partir da indicação do programa Mega v.5 (Tamura et al. 2011) que também indicou o método com a utilização de 1000 réplicas de “bootstrap.

Uma vez que todas as amostras possuem um mesmo ancestral conhecido (Sabin 1) não foi possível estabelecer um claro relacionamento de ancestralidade entre elas, apesar de ser possível notar diferenças com relação ao número de mutações das amostras de PV1 analisadas, em comparação com a sequência padrão Sabin. Além disso, não foi possível obter informações acerca do relacionamento geográfico e/ou temporal.

FIGURA 4.5: Árvore filogenética construída pelo algoritmo Neighbor-Joining para as 70 amostras analisadas dos poliovírus sorotipo 1.



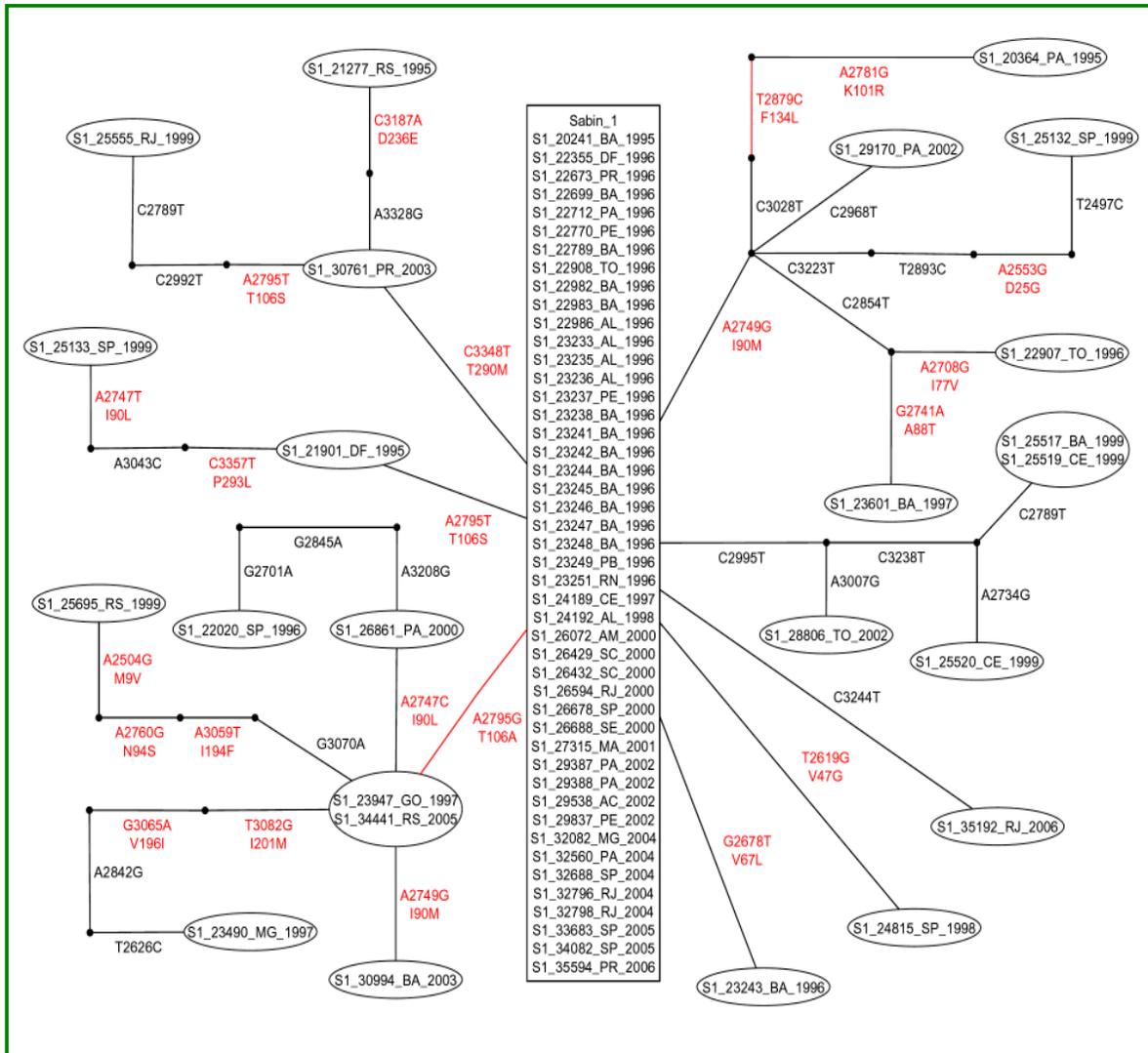
As linhas horizontais são proporcionais às diferenças entre as seqüências nucleotídicas das amostras e os números indicam a consistência destes ramos (1000 réplicas de “bootstrap”). A cepa referência vacinal 1 (Sabin 1) está indicada com a seta. Não foram inclusas seqüências como grupo externo.

#### 4.1.1.1.2. Rede de Haplótipos (PV1)

A rede de haplótipos permite um estudo populacional agrupando indivíduos com o mesmo tipo de ocorrência. A representação através da rede de haplótipos das 70 amostras de PV1 relacionadas à vacina na região de VP1 em comparação com a cepa de referência vacinal (Sabin 1) está indicada na Figura 4.6. A identificação das amostras inicia com o sorotipo, seguido do registro do LEV, o estado e o ano onde o caso foi diagnosticado. A cepa vacinal de referência (Sabin 1) está localizada no retângulo agrupada com as demais amostras que apresentaram 100% de identidade a esta. Cada mutação está representada por um segmento de reta com a posição que o nucleotídeo ocupa dentro do genoma. A diferença de tamanho entre eles não está associada a nenhum parâmetro. Os segmentos de retas em vermelho indicam as mutações relacionadas ao fenótipo selvagem associadas à neurovirulência (2493 e 2879). Na posição 2493, sete amostras dentre as 70 apresentaram este comportamento, e na posição 2879 somente uma amostra. A posição no genoma em que foi encontrada a mutação está localizada acima do segmento de reta. A letra da esquerda indica o nucleotídeo da cepa vacinal de referência e a letra da direita indica a mutação encontrada na amostra analisada. Abaixo da identificação do nucleotídeo está indicada a posição do aminoácido dentro da VP1 e a sua troca (substituições não sinônimas), sendo a letra da esquerda referente à cepa vacinal e a letra da direita, ao aa da amostra. Substituições sinônimas não foram indicadas. Amostras contidas em um mesmo círculo possuem uma identidade total entre as sequências.

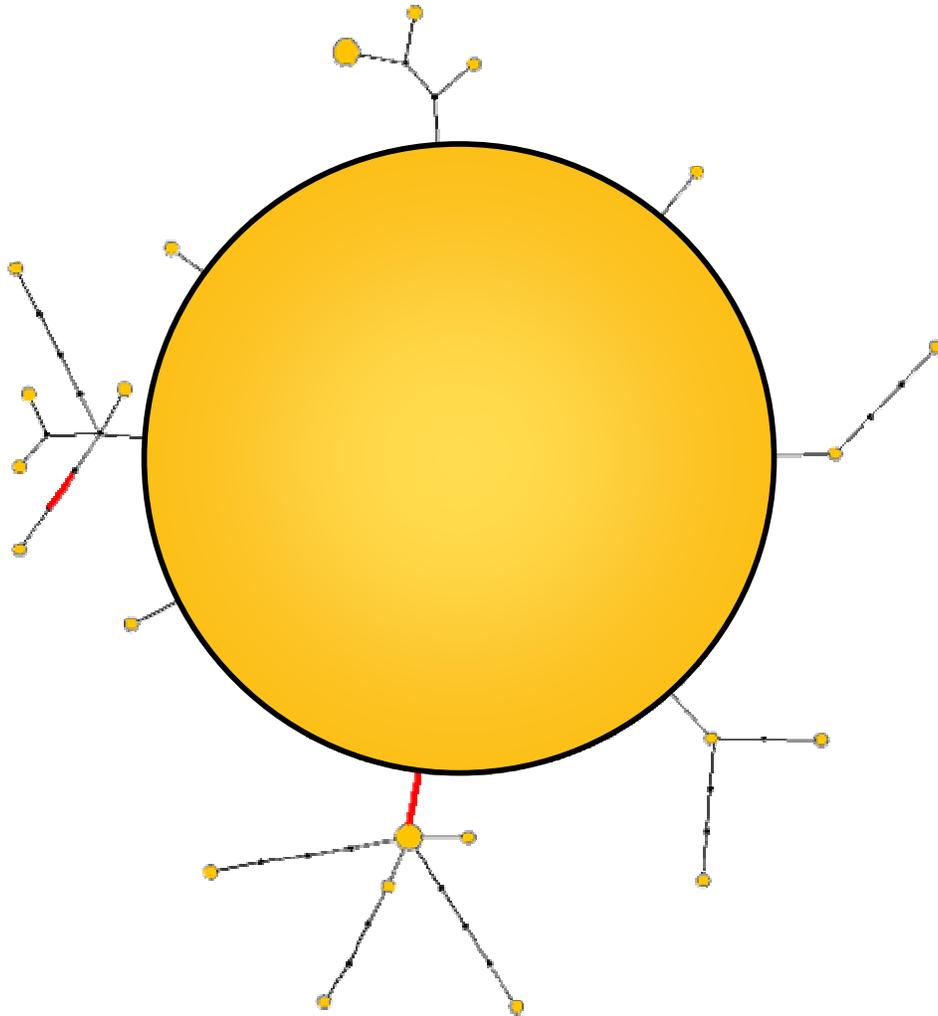
A Figura 4.7 é uma representação gráfica da Figura 4.6. Os círculos possuem um diâmetro proporcional ao número de amostras que estão neles contidos definindo as mutações que ocorrem com maior frequência.

FIGURA 4.6: Rede de haplótipos dos isolados de poliovírus sorotipo 1.



Representação da rede de haplótipos de PV1 na região de VP1 pelo sequenciamento nucleotídico em comparação com a cepa vacinal (Sabin 1). As amostras são identificadas com o sorotipo, seguido do registro do LEV, o estado e o ano onde o caso foi diagnosticado. O retângulo representa o conjunto de amostras com 100% de identidade em relação à cepa vacinal de referência (Sabin 1). Cada mutação é representada por um segmento de reta com a posição que o nucleotídeo ocupa no genoma. A letra a esquerda indica o nucleotídeo da cepa vacinal de referência e a letra da direita, a mutação encontrada na amostra. Os segmentos de retas em vermelho indicam as mutações relacionadas ao fenótipo selvagem. Círculos contendo mais de uma amostra representam uma identidade de 100% entre as sequências. Abaixo da identificação do nucleotídeo está indicada a posição do aminoácido dentro da VP1 e a sua troca (substituições não sinônimas), sendo a letra da esquerda o referente à cepa vacinal e a da direita o aa da amostra. Não foram representados aminoácidos que apresentaram substituições sinônimas.

FIGURA 4.7: Representação gráfica da rede de haplótipos do poliovírus sorotipo 1



Representação gráfica da rede de haplótipos da região de VP1 das amostras de PV1 através do sequenciamento nucleotídico, em comparação com a cepa vacinal de referência (Sabin 1). O diâmetro dos círculos é proporcional ao número de amostras neles contidos. As sequências que são agrupadas no mesmo círculo apresentam 100% de identidade entre elas. Cada mutação está representada por um segmento de reta e os segmentos em vermelho indicam mutações relacionadas ao fenótipo selvagem associada à neurovirulência.

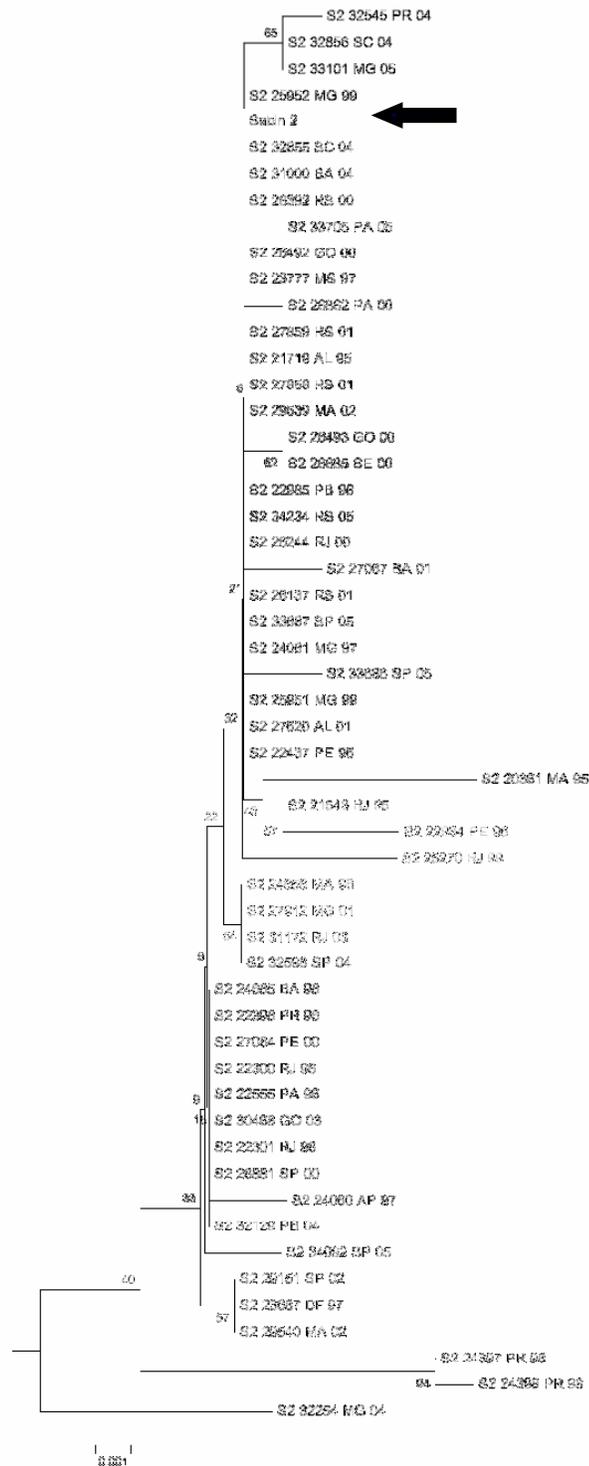
#### **4.1.1.2. Análise de VP1 para poliovírus sorotipo 2**

Seguindo o mesmo procedimento indicado no item 4.1.1.1, as 53 amostras de PV2 foram sequenciadas e editadas, quando necessário, no programa Bioedit e seus resultados alinhados em relação à cepa de referência vacinal (Sabin 2).

##### **4.1.1.2.1. Análise Filogenética (PV2)**

A árvore filogenética para os PV2 foi construída no algoritmo Neighbor-Joining, utilizando o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros (K2), conforme descrição no item material e métodos. O programa Mega v5 indicou o método e neste caso não indicou que fosse aplicada a distribuição Gamma. Foram utilizadas 1000 réplicas de “bootstrap”. Uma vez que todas as amostras possuem um mesmo ancestral conhecido (Sabin 2) não foi possível estabelecer um claro relacionamento de ancestralidade entre elas, apesar de ser possível notar diferenças com relação ao número de mutações das amostras de PV2 analisadas, em comparação com a sequência padrão Sabin. A amostra 32254 ficou destacada das demais na árvore devido ao número de mutações e posições em VP1. Outro ramo que se destacou foi aquele onde as amostras 24397 e 24398 estão localizadas. Essas duas amostras são de um paciente que foi submetido a duas coletas de fezes com intervalo de 10 dias entre a primeira e a segunda. A amostra 24397 possui 10 mutações e a 24398 com 11 mutações. Tanto a amostra 32254 como 24397 e 24398 foram classificadas como PVDV 2. A amostra 20361, que se encontra afastada da barra vertical, possui seis mutações que, para os atuais parâmetros da OMS, é considerado também como PVDV 2. As 19 amostras que possuem identidade de 100% com a cepa de referência Sabin 2 estão distribuídas na barra vertical. O conjunto de nove amostras na parte inferior da árvore possui uma única mutação associada à reversão de neurovirulência (T2909C). Não foi possível obter informações acerca do relacionamento geográfico e/ou temporal.

FIGURA 4.8: Árvore filogenética construída pelo algoritmo de Neighbor-Joining para as 53 amostras de poliovírus sorotipo 2.



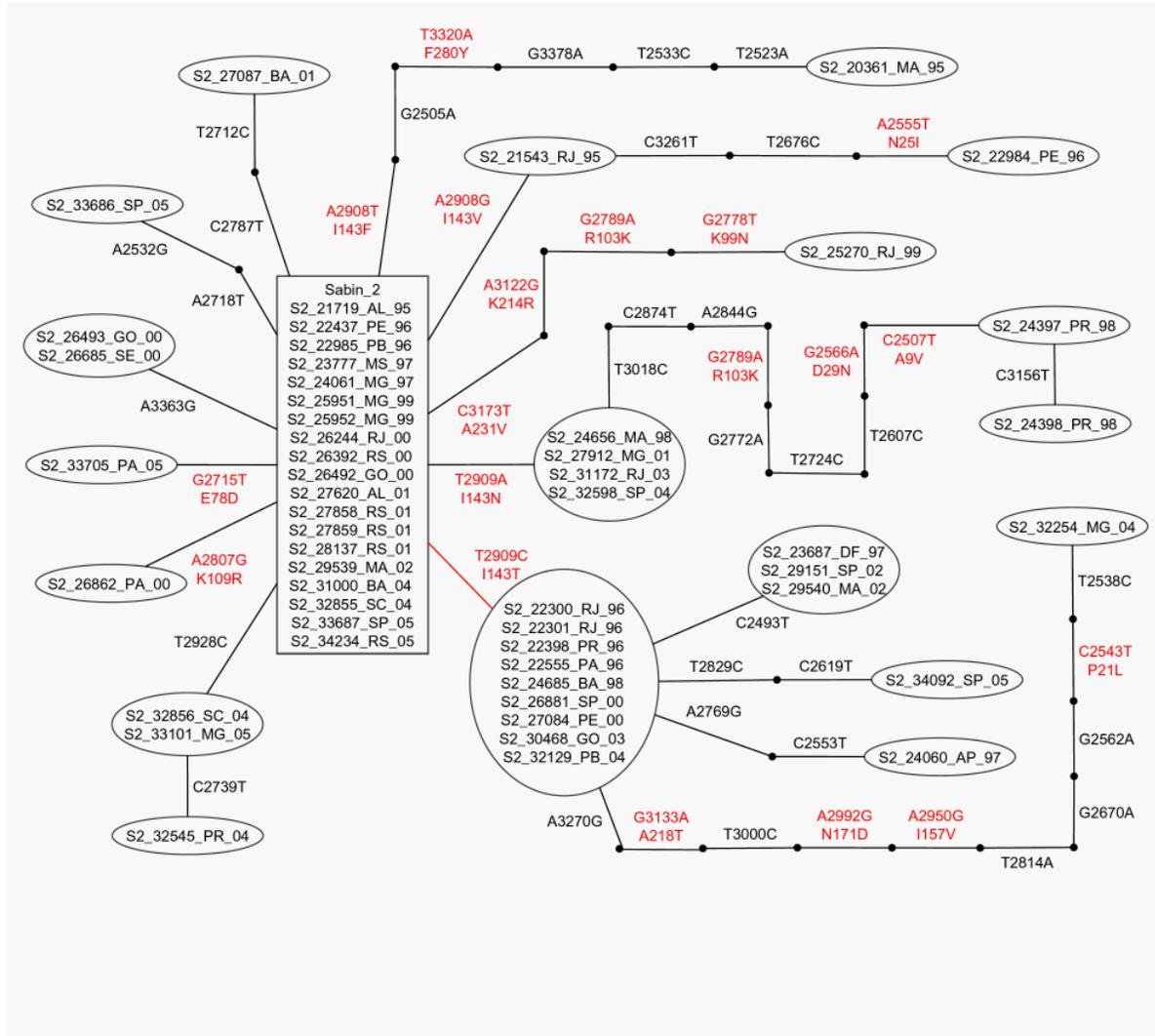
As linhas horizontais são proporcionais às diferenças entre as sequências nucleotídicas das amostras e os números indicam a consistência destes ramos (1000 réplicas de “bootstrap”). A cepa referência vacinal 2 (Sabin 2) está indicada com a seta. As sequências como grupo externo não foram incluídas.

#### 4.1.1.2.2. Rede de Haplótipos (PV2)

A rede de haplótipos permite um estudo populacional agrupando indivíduos com o mesmo tipo de ocorrência. A representação através da rede de haplótipos das 53 amostras de PV2 relacionadas à vacina na região de VP1 em comparação com a cepa de referência vacinal (Sabin 2) está indicada na Figura 4.9. A identificação das amostras inicia com o sorotipo, seguido do registro do LEV, o estado e o ano onde o caso foi diagnosticado. A cepa vacinal de referência (Sabin 2) está localizada no retângulo agrupada com as demais amostras que apresentaram 100% de identidade em relação a esta. Cada mutação está representada por um segmento de reta com a posição que o nucleotídeo ocupa dentro do genoma. A diferença de tamanho dos segmentos de reta não está associada a nenhum parâmetro. O segmento de reta em vermelho indica à mutação relacionada ao fenótipo selvagem associada à neurovirulência. A posição no genoma em que foi encontrada a mutação está localizada acima do segmento de reta. A letra da esquerda indica o nucleotídeo da cepa vacinal de referência e a letra da direita à mutação encontrada na amostra. Abaixo da identificação do nucleotídeo está indicada a posição do aminoácido dentro da VP1 e a sua troca (substituições não sinônimas), com a letra da esquerda, referente à cepa vacinal e a letra da direita, ao aa da amostra. Substituições sinônimas não foram indicadas. Amostras contidas em um mesmo círculo possuem uma identidade total entre as sequências (Figura 4.9).

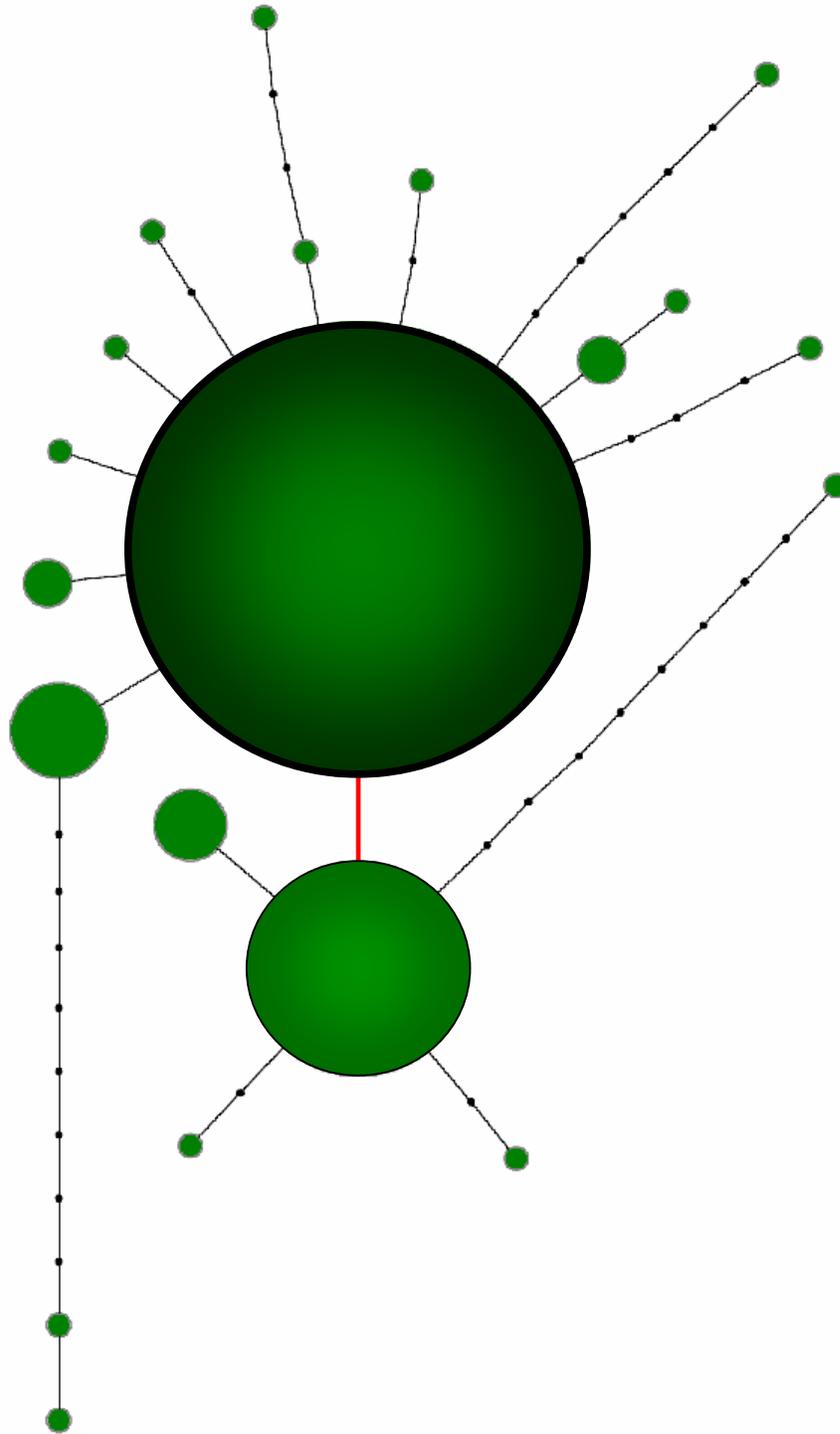
A Figura 4.10 é uma representação gráfica da Figura 4.9. Os círculos possuem um diâmetro proporcional ao número de amostras que neles estão contidos, definindo as mutações que ocorrem com maior frequência. O círculo mais escuro contém a cepa de referência Sabin 2 e as amostras com identidade de 100% em relação a ela. Este tipo de representação permitiu avaliar o perfil da estabilidade, a identificação dos PVDV pelo número de mutações e o padrão em que ocorreram.

FIGURA 4.9: Rede de haplótipos dos isolados de poliovírus sorotipo 2



Representação da rede de haplótipos de PV2 na região de VP1 pelo sequenciamento nucleotídico em comparação com a cepa vacinal (Sabin 2). As amostras são identificadas com o sorotipo, seguido pelo registro do LEV, o estado e o ano onde o caso foi diagnosticado. O retângulo representa o conjunto de amostras com 100% de identidade em relação à cepa vacinal de referência (Sabin 2). Cada mutação é representada por um segmento de reta com a posição que o nucleotídeo ocupa no genoma. A letra da esquerda indica o nucleotídeo da cepa vacinal de referência e a letra da direita, a mutação encontrada na amostra. O segmento de reta em vermelho indica a mutação relacionada ao fenótipo selvagem. Círculos contendo mais de uma amostra representam uma identidade total entre as sequências. Abaixo da identificação do nucleotídeo está indicada a posição do aminoácido dentro da VP1 e a sua troca (substituições não sinônimas), sendo a letra da esquerda o referente à cepa vacinal e a da direita ao aa da amostra. Não foram representados aminoácidos Substituições sinônimas não foram indicadas. Amostras contidas em um mesmo círculo possuem uma identidade total entre as sequências.

FIGURA 4.10: Representação gráfica da rede de haplótipos do poliovírus sorotipo 2.



Representação gráfica da rede de haplótipos de PV2 na região de VP1 pelo sequenciamento nucleotídico em comparação com a cepa vacinal (Sabin 2). O tamanho dos círculos é proporcional ao número de amostras que apresentam o mesmo perfil de identidade. Os segmentos de reta que conectam os círculos representam uma mutação, sendo que o vermelho indica a mutação relacionada ao fenótipo selvagem em relação à neurovirulência.

#### **4.1.1.3. Análise de VP1 para poliovírus sorotipo 3**

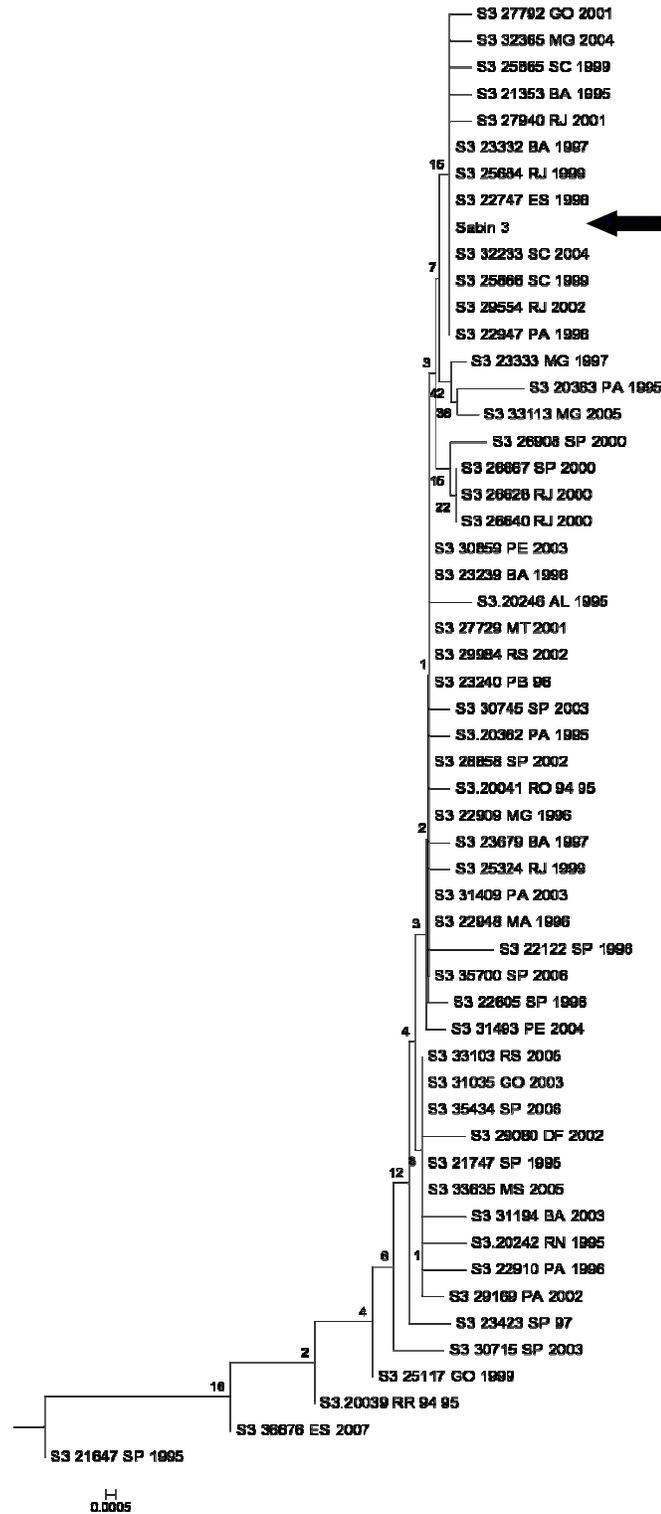
Seguindo o mesmo procedimento indicado nos itens anteriores, as 54 amostras foram sequenciadas e editadas, quando necessário, no programa Bioedit com seus resultados alinhados em relação à cepa de referência vacinal (Sabin 3).

##### **4.1.1.3.1. Análise Filogenética (PV3)**

A árvore filogenética mostrando o relacionamento entre os poliovírus do sorotipo 1 foi construída no algoritmo Neighbor-Joining utilizando o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros com distribuição Gamma (K2+G), conforme descrição no item material e métodos. O valor de gamma utilizado para esta árvore foi 0,1827 a partir da indicação do programa Mega v.5 (Tamura et al. 2011) que também indicou o método com a utilização de 1000 réplicas de “bootstrap.

Uma vez que todas as amostras possuem um mesmo ancestral conhecido (Sabin 3) não foi possível estabelecer um claro relacionamento de ancestralidade entre elas, apesar de ser possível notar várias diferenças com relação ao número de mutações das amostras de PV3 analisadas, em comparação com a sequência padrão Sabin. A amostra 21647 ficou destacada das demais na árvore por suas 4 mutações serem distintas da maioria, porém semelhante a outras quatro que abriram ramos próximos. Várias amostras com o mesmo número de mutações foram agrupadas de forma distante. Outro ramo que se destacou foi aquele que apresentou amostras com apenas uma mutação, porém não relacionada à reversão de neurovirulência em VP1 (ramo localizado na parte superior da árvore). Apenas sete amostras das 53 analisadas apresentaram 100% de identidade em relação à cepa de referência Sabin 3. As 10 amostras, nas quais a 28858 está incluída, apresentaram apenas a mutação relacionada à reversão de neurovirulência (C2493T) e se distribuíram próximas à barra vertical do ramo que inicia com a amostra 30859 e termina com a amostra 35700. Embora seja possível observar a distribuição das amostras com mutações na árvore filogenéticas, não fica claro em que posição particular ocorreu a mutação. Assim como os demais sorotipos, não foi possível obter informações acerca do relacionamento geográfico e/ou temporal.

FIGURA 4.11: Árvore filogenética construída pelo algoritmo de Neighbor-Joining para as 54 amostras de poliovírus sorotipo 3.



As linhas horizontais são proporcionais às diferenças entre as sequências de nucleotídeos das amostras e os números indicam a consistência destes ramos (1.000 réplicas de “bootstrap”). A cepa referência vacinal 3 (Sabin 3) está indicada com a seta. Não foram inclusas sequências como grupo externo.

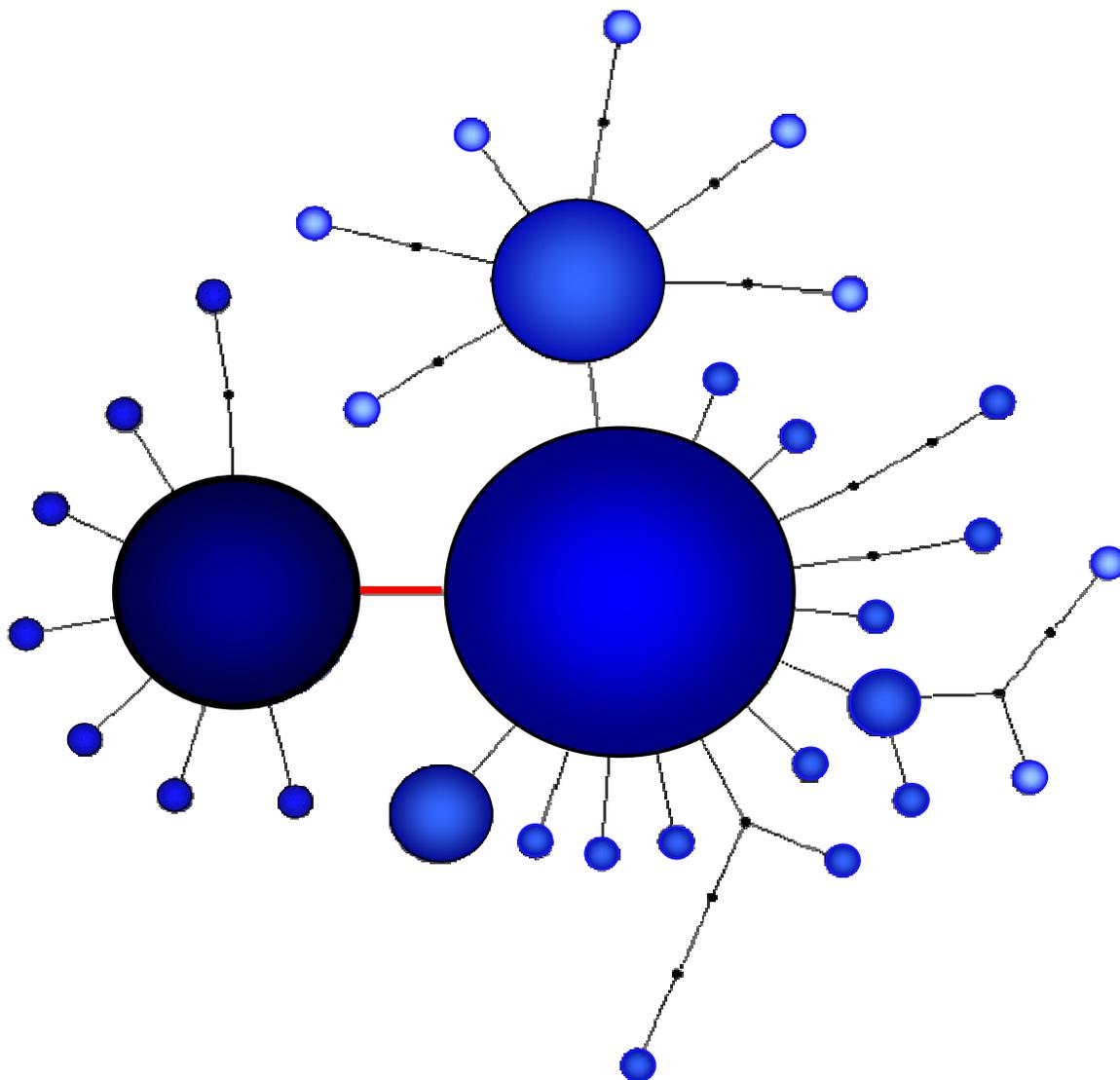
#### 4.1.1.3.2. Rede de Haplótipos (PV3)

A rede de haplótipos permite um estudo populacional agrupando indivíduos com o mesmo tipo de ocorrência. A representação através da rede de haplótipos das 54 amostras de PV3 relacionadas à vacina na região de VP1 em comparação com a cepa de referência vacinal (Sabin 3) está indicada na Figura 4.12. A identificação das amostras inicia com o sorotipo, seguido pelo registro do LEV, o estado e o ano onde o caso foi diagnosticado. A cepa vacinal de referência (Sabin 3) está localizada no retângulo agrupada com as demais amostras que apresentaram 100% de identidade em relação a esta. Cada mutação está representada por um segmento de reta com a posição que o nucleotídeo ocupa dentro do genoma. A diferença de tamanho dos segmentos de reta não está associada a nenhum parâmetro. O segmento de reta em vermelho indica à mutação relacionada ao fenótipo selvagem associada à neurovirulência. A posição no genoma em que foi encontrada a mutação está localizada acima do segmento de reta. A letra da esquerda indica o nucleotídeo da cepa vacinal de referência e a letra da direita à mutação encontrada na amostra. Abaixo da identificação do nucleotídeo está indicada a posição do aminoácido dentro da VP1 e a sua troca (substituições não sinônimas), sendo a letra da esquerda o referente à cepa vacinal e a da direita ao aa da amostra. Substituições sinônimas não foram indicadas. Amostras contidas em um mesmo círculo possuem uma identidade total entre as sequências (Figura 4.12).

A Figura 4.13 é uma representação gráfica da Figura 4.12. Os círculos possuem um diâmetro proporcional ao número de amostras que neles estão contidos definindo as mutações que ocorrem com maior frequência. O círculo mais escuro contém a cepa de referência Sabin 3 e as amostras com identidade de 100% em relação a ela. Este tipo de representação permitiu avaliar o perfil da estabilidade e o padrão em que ocorreram as mutações.



FIGURA 4.13: Representação gráfica da rede de haplótipos do poliovírus sorotipo 3



Representação gráfica da rede de haplótipos de PV3 na região de VP1 pelo sequenciamento nucleotídico em comparação com a cepa vacinal (Sabin 3). O tamanho dos círculos é proporcional ao número de amostras que apresentam o mesmo perfil de identidade. Cada segmento de reta que conecta os círculos representa uma mutação, sendo que o vermelho indica a mutação relacionada

#### **4.1.2. Análise nucleotídica da região 5'NC do genoma de poliovírus**

A região da 5'NC dos poliovírus foi amplificada pela técnica de RT-PCR, utilizando-se os “primers” EVR e S11S (descrita no item 3.7.2). Todos os isolados analisados mostraram como produto da amplificação da PCR, um fragmento com tamanho característico de 700 pb. Esse material amplificado foi sequenciado conforme descrito em material e métodos. Foram analisados 68 isolados dos três sorotipos sendo 27 do sorotipo 1, 21 do sorotipo 2 e 20 do sorotipo 3.

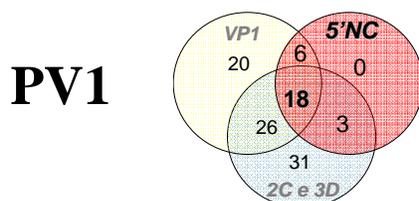
Os diagramas da Figura 4.14 mostram o número de amostras analisadas cujos círculos em destaque correspondem à região 5'NC tratada nesse item.

Os resultados de 5'NC estão representados em quadros, separados por sorotipos. Cada quadro indica a posição nucleotídica estudada e os nucleotídeos presentes nessas posições nas cepas vacinais e nos vírus selvagens.

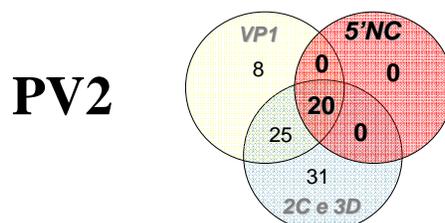
Dos 27 isolados de poliovírus 1, 21 permaneceram sem alteração no nucleotídeo 480 e cinco apresentaram reversão. Uma amostra não apresentou reversão no nucleotídeo 480, mas apresentou a reversão no nucleotídeo 525 semelhante ao vírus selvagem. Dos 20 isolados do sorotipo 2, sete foram semelhantes ao Sabin 2 e 13 apresentaram reversão. Já o sorotipo 3 apresentou quatro isolados idênticos ao Sabin 3 e 17 isolados com reversão.

Os sorotipos apresentaram taxas de reversão de neurovirulência bem distintas com 18,5% de amostras com reversão para o sorotipo 1, 65% para o sorotipo 2 e 81% para o sorotipo 3 como dados apresentados na Figura 4.14.

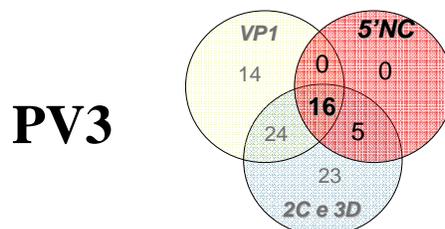
FIGURA 4.14: Análise da região 5'NC de poliovírus tipo 1, 2 e 3 em relação ao principal nucleotídeo envolvido na atenuação de cada um dos sorotipos.



Amostras	Posição 480		Posição 525	
	Sabin (Vacinal)	Mahoney (Selvagem)	Sabin	Mahoney
	Guanina (G)	Adenina (A)	Timina (T)	Citosina (C)
n= 27	21 (77,7%)	5 (18,5%)	0	1 (3,7%)



Amostras	Posição 481	
	Sabin (Vacinal)	P712 (Selvagem)
	Adenina (A)	Guanina (G)
n= 20	7 (35%)	13 (65%)



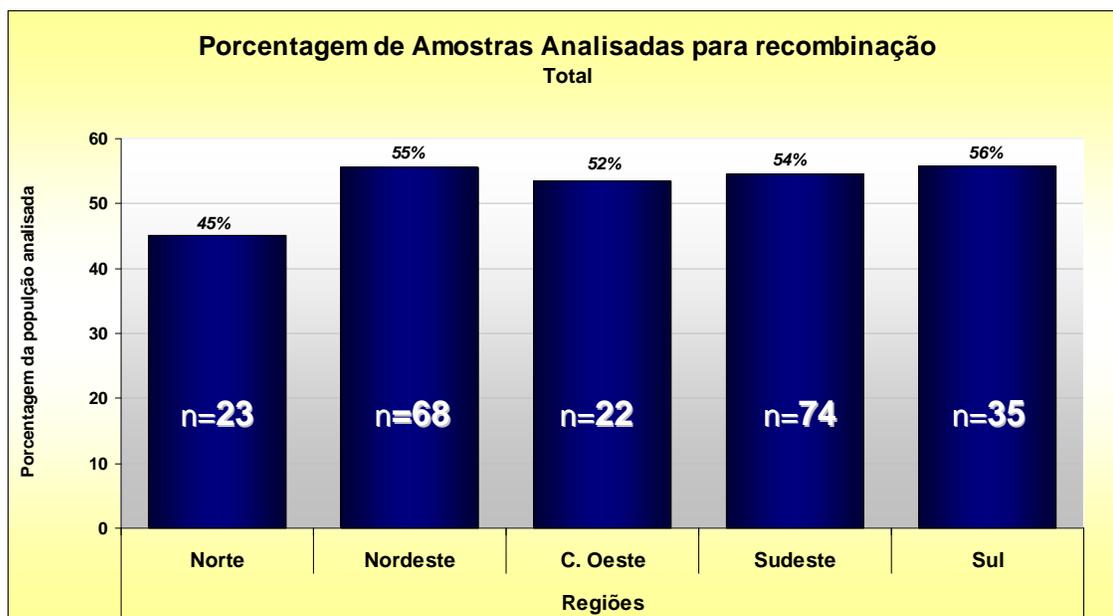
Amostras	Posição 472	
	Sabin (Vacinal)	Leon (Selvagem)
	Timina (T)	Citosina (C)
n= 21	4 (19%)	17 (81%)

Os diagramas representam as amostras analisadas nas regiões VP1, 2C-3D e 5'NC. Os círculos de cor rosa mostram o número de amostras analisadas em 5'NC. Os resultados encontram-se nos quadros abaixo dos diagramas. A posição nucleotídica que representa a atenuação encontra-se no alto de cada quadro em função do sorotipo. A coluna central informa o nucleotídeo encontrado na cepa vacinal, o número de amostras que apresentaram identidade e sua porcentagem. Já a coluna da direita informa o nt na cepa selvagem que deu origem à cepa vacinal, o número de amostras que apresentaram a mutação e a porcentagem.

#### 4.1.3. Análise das regiões 2C e 3D (recombinação)

De um total de 415 amostras foram analisadas 222 amostras de poliovírus dos 3 sorotipos com 78 isolados do tipo 1, 76 do tipo 2 e 68 do tipo 3 oriundas de todas as regiões geográficas no período de 1995 a 2007. Foram selecionadas de 45% a 56% do total das amostras analisadas no LEV em cada uma das regiões (Figura 4.15). A técnica de RT-PCR duplex que foi utilizada não é adequada para amostras em que foram isolados mais de um sorotipo de poliovírus. O procedimento utilizado e os reagentes estão descritos no item material e métodos.

FIGURA 4.15: Distribuição das amostras de poliovírus analisadas para recombinação em 2C e 3D por região geográfica do Brasil no período de 1995 a 2007.



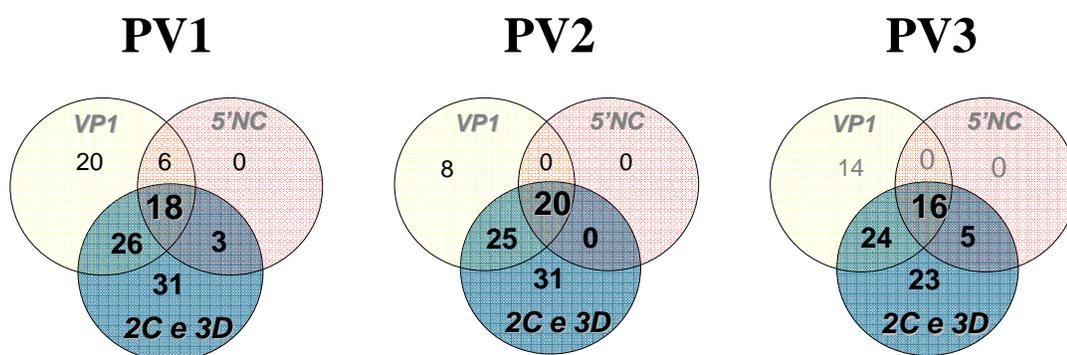
O gráfico representa a porcentagem de amostras de poliovírus analisadas, divididas por regiões geográficas processadas no LEV, no período de 1995 a 2007. As amostras foram selecionadas aleatoriamente dentro de cada sorotipo. O número no centro da barra representa a quantidade de amostras selecionadas, por regiões geográficas, para o estudo de 2C e 3D.

Os números de amostras analisadas das regiões 2C e 3D estão apresentados em conjunto, separados por sorotipos, sob a forma de diagramas. Os círculos da análise de 2C e

3D estão em destaque (azul). O quadro abaixo dos diagramas informa detalhadamente a porcentagem total de amostras recombinadas bem como seus padrões de recombinação.

Os sorotipos apresentaram padrões e taxas de recombinação bem distintos, com 1,3% das amostras com recombinação para o sorotipo 1, 6,6% para o sorotipo 2 e 13,1 % para o sorotipo 3 conforme dados apresentados na Figura 4.16. A representação gráfica das 15 amostras, que apresentaram recombinação, encontra-se na Figura 4.18.

FIGURA 4.16: Análise das amostras de PV1, PV2 e PV3 nas regiões de 2C e 3D



Regiões 2C e 3D							
Sorotipo	Amostras analisadas	Sem recombinação	Com recombinação			Total recombinadas	% Recombinados
			2C	3D	2C+3D		
<b>PV1</b>	<b>78</b>	<b>77</b> (98,7%)	0	0	1	1	<b>1,3%</b>
<b>PV2</b>	<b>76</b>	71 (93,4%)	0	5	0	5	<b>6,6%</b>
<b>PV3</b>	<b>68</b>	59 (86,8%)	0	3	6	9	<b>13,2%</b>

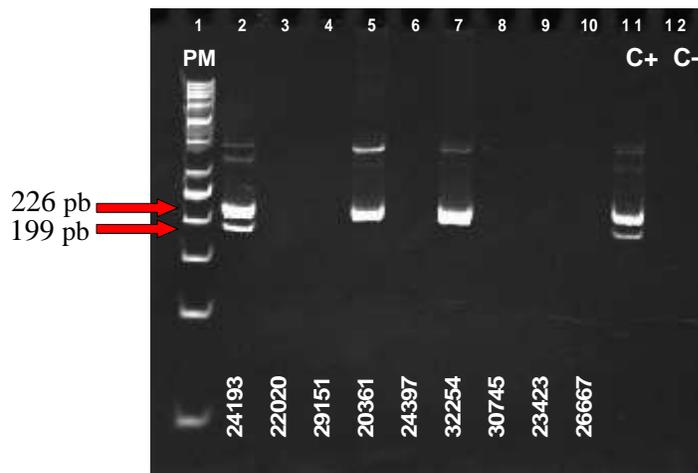
Os diagramas representam as amostras analisadas nas regiões VP1, 2C-3D e 5'NC. Os círculos de cor azul mostram o número de amostras analisadas em 2C-3D. Os resultados encontram-se no quadro abaixo. O quadro informa o número total de amostras analisadas, amostras sem recombinação e recombinadas em 2C, 3D e 2C+3D para cada um dos sorotipos. A última coluna do quadro informa a porcentagem de amostras que apresentaram recombinação, independente da região.

Os géis A, B e C apresentam a mesma ordem de aplicação das amostras. No gel A foi possível observar o resultado da amplificação das amostras que foram analisadas com o conjunto de primers S1-REC; no gel B, o resultado das amostras avaliadas com o conjunto de primers S2-REC e no gel C, o resultado das amostras avaliadas com o conjunto de primers S3-REC. Os tamanhos dos produtos para o sorotipo 1(S1-REC) foram de 199 pb (2C) e 226 pb (3D), para o sorotipo 2 (S2-REC), de 189 pb (2C) e 225 pb (3D) e para o sorotipo 3 (S3-REC), de 199 pb (2C) e 228 pb (3D).

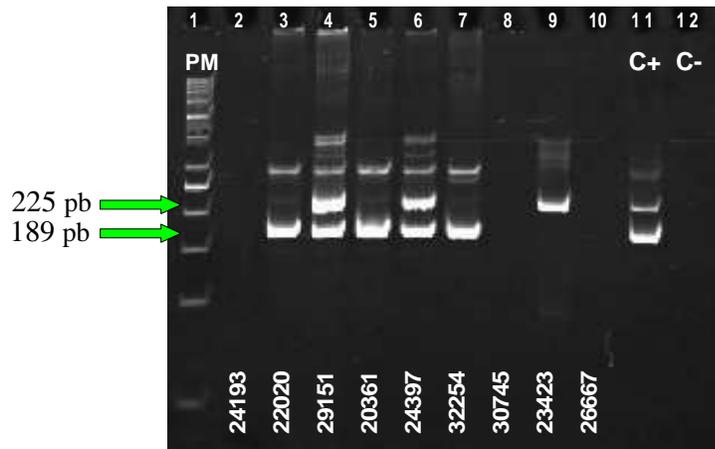
As amostras regulares 24193, 24397, 29151 e 30745 apresentaram amplificação em ambas as regiões quando submetidas à reação de PCR com o conjunto de primers correspondente aos seus sorotipos. Esse resultado pode ser visualizado no gel A poço dois, para amostra 24193; no gel B poços quatro e seis, para as amostras 29151 e 24397, respectivamente, e no gel C poço oito, para amostra 30745. Para essas amostras não foi observada reação de amplificação com os conjuntos de primers dos demais sorotipos. A amostra 22020 é um exemplo de recombinação com os dois sorotipos, uma amostra PV1 que apresenta 2C de PV2 (gel B poço três) e 3D de PV3 (gel C poço três). As amostras 20361 e 23423 são exemplos de recombinação em apenas uma das regiões, gel A poço cinco para 20361 e gel B poço nove. A amostra 26667 não apresentou amplificação em nenhum conjunto de primer, fato que indica recombinação heterotípica, isto é, recombinação com outro enterovírus que não poliovírus (poços 10 dos géis A, B e C).

FIGURA 4.17: Perfil eletroforético de amostras analisadas em relação a padrão de recombinação nas regiões 2C e 3D.

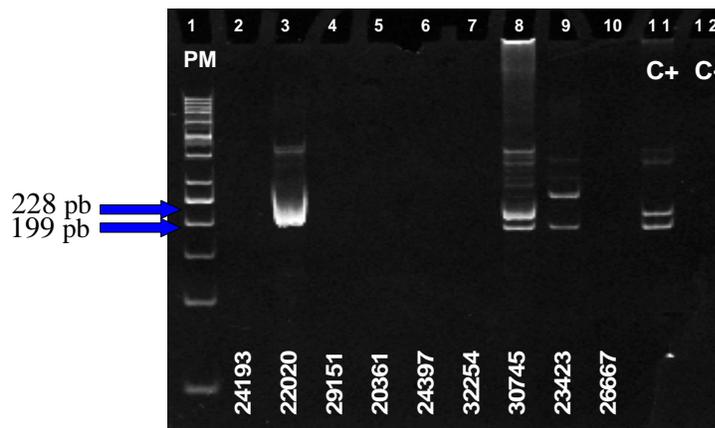
**a. S1-REC**



**b. S2-REC**



**c. S3-REC**

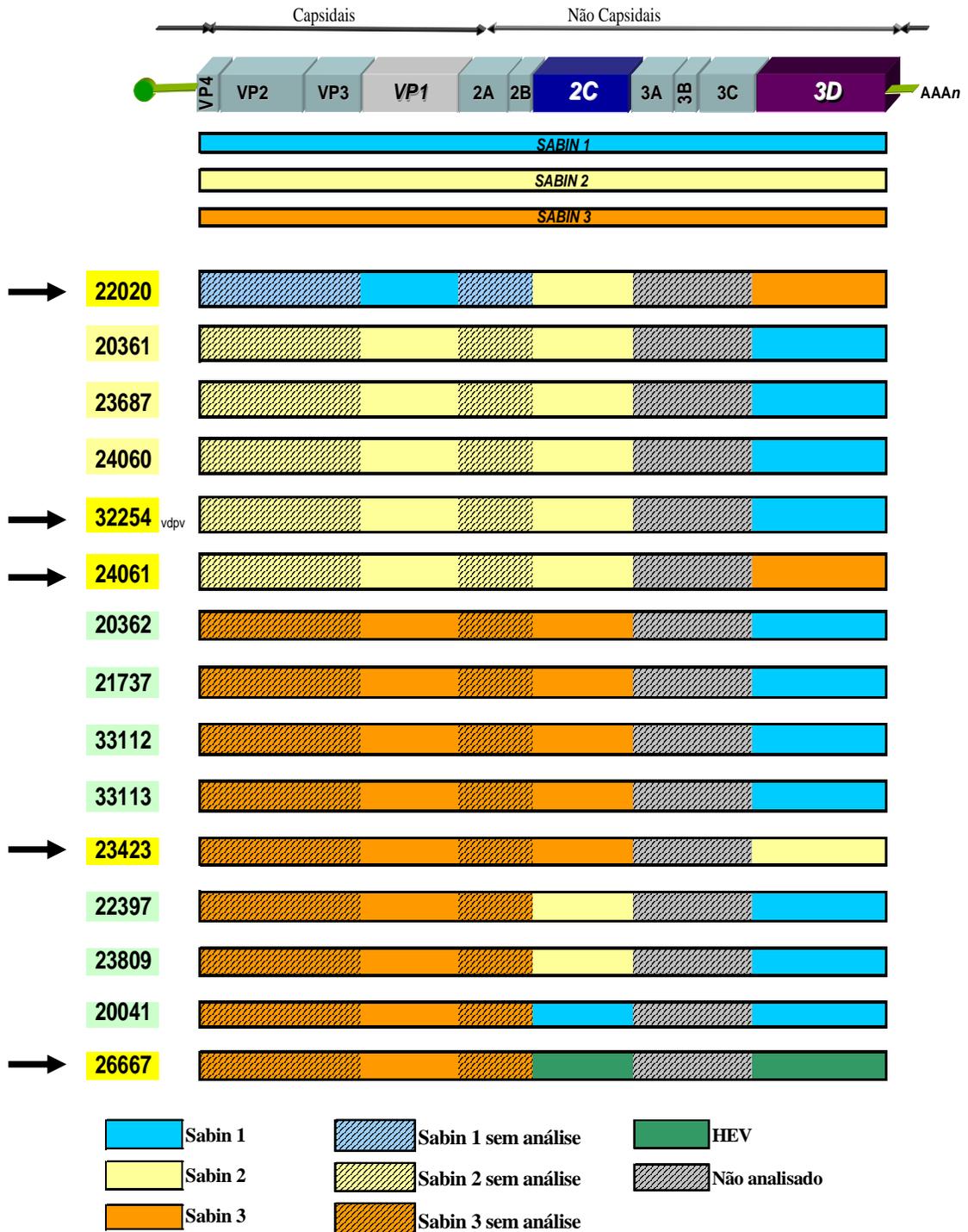


Os géis apresentam o perfil eletroforético das amostras avaliadas para recombinação em 2C e 3D.  
Gel A- Linhas 1 PM; Linhas de 2 a 10 amostras 24193, 22020, 29151, 20361, 24397, 32254, 30745, 23423 e 2667 amplificadas com primers S1-REC; Linhas 11 e 12 controle positivo (Sabin 1) e controle negativo, respectivamente.  
Gel B- Linhas 1 PM; Linhas de 2 a 10 amostras 24193, 22020, 29151, 20361, 24397, 32254, 30745, 23423 e 2667 amplificadas com primers S2-REC; Linhas 11 e 12 controle positivo (Sabin 2) e controle negativo, respectivamente.  
Gel C- Linhas 1 PM; Linhas de 2 a 10 amostras 24193, 22020, 29151, 20361, 24397, 32254, 30745, 23423 e 2667 amplificadas com primers S3-REC; Linhas 11 e 12 controle positivo (Sabin 3) e controle negativo, respectivamente.

Os resultados mostraram que sete padrões de recombinação foram detectados nas 222 amostras analisadas. O maior número de amostras recombinantes foi detectado no vírus de sorotipo 3, seguido pelo sorotipo 2 e, em menor quantidade, pelo sorotipo 1. O gene que codifica a proteína 3D apresentou maior tendência à recombinação que a região 2C.

A Figura 4.18 apresenta os diferentes perfis das 15 amostras com recombinação genômica nas regiões 2C e 3D. A imagem representa, de forma esquemática, o genoma dos enterovírus identificando as regiões não codificantes 5' e 3', proteínas do capsídeo e não estruturais. Algumas das amostras abaixo constam nas Figura 4.18 itens a, b e c.

FIGURA 4.18: Padrão de recombinação dos poliovírus vacinais isolados de casos de PFA



Localização dos pontos de recombinação dos poliovírus vacinais isolados de casos de PFA. Na representação do genoma dos poliovírus, a única fase de leitura aberta (ORF) está indicada por um retângulo, flanqueada pelas regiões 5' e 3' não codificantes. Os retângulos de cor sólida foram investigados e coloridos de acordo com o sorotipo. Os retângulos hachurados, correspondendo à cor do sorotipo do poliovírus, representam que embora não tenham sido investigados, não existem indicações que sejam de outro sorotipo. As amostras indicadas pelas setas estão nos géis de poliácridamida nas Figuras 4.17 a, b e c.

#### 4.1.4. Avaliação conjunta das regiões genômicas 5'NC, VP1, 2C e 3D dos três sorotipos de poliovírus

Como indicado na Figura 3.2 no item material e métodos, 44 amostras foram analisadas em todas as regiões do genoma abordadas neste estudo, sendo 18 amostras de PV1, 20 amostras de PV2 e 16 amostras de PV3. A comparação dos resultados obtidos, para cada região, por amostra e por sorotipo, está descrita nas Tabelas 4.1, 4.2 e 4.3.

A avaliação da região da VP1 foi baseada na identificação do número de mutações nucleotídicas obtidas em todo o gene, frente à cepa vacinal correspondente e os valores encontrados estão descritos nas tabelas de cada sorotipo 4.1, 4.2 e 4.3, na coluna especificada “mutações em VP1”. O destaque, em rosa, dos valores, informa que a mutação de maior importância ligada à reversão de neurovirulência em VP1 está presente. No caso do PV1, essa mutação é a G2795A; para o PV2, a mutação é T2909C e, para o PV3, é T2493C. O nt anterior à numeração refere-se ao nt presente na cepa de referência vacinal e o nt posterior ao número ao encontrado nos isolados. Também foi indicado, para cada amostra, a presença ou não, de mutações não sinônimas na VP1. Nestes casos, a troca de aminoácidos e a posição na VP1 foram especificados nas colunas “mutações não sinônimas”; da mesma forma; a primeira letra referente ao aa presente na cepa de referência, com o número indicando a posição deste aa na VP1 e a letra seguinte, referente ao aa encontrado nos isolados.

A avaliação de 5'NC foi baseada na identificação de mutações nas posições importantes para a reversão de neurovirulência, que são 480 e 525 para PV1; 481 para PV2 e 472 para PV3. As mutações dos nucleotídeos foram representadas obedecendo ao padrão já descrito, onde o nt anterior refere-se à cepa de referência vacinal, o número a posição do nt no genoma e o nt posterior refere-se ao encontrado nos isolados. Os resultados estão descritos nas Tabelas 4.1, 4.2 e 4.3, coluna 5'NC.

A avaliação das regiões 2C e 3D foi baseada na observação de amplificação do material genômico quando submetido ao conjunto de primers de recombinantes para os 3 sorotipos. Os resultados estão descritos nas Tabelas 4.1, 4.2 e 4.3 coluna “2C+3D”. O resultado regular indica que a amostra apresentou, tanto na região 2C como na 3D, genoma do mesmo sorotipo ao qual a mostra foi primeiramente tipificada. Os resultados sombreados indicam a presença de recombinação. Quanto à região e ao sorotipo recombinante, estes estão especificados, logo após o sorotipo da amostra. Cabe destacar no sorotipo 3, que a amostra 26667 apresenta, nas duas regiões estudadas, recombinação heterotípica, isto é, recombinação com outro enterovírus que não poliovírus (Tabela 4.3).

Podemos observar para o sorotipo 1, Tabela 4.1, que, das cinco amostras que apresentaram pelo menos uma mutação em VP1, quatro obtiveram também a reversão em 5'NC. Somente uma amostra (24189) apresentou reversão na região 5'NC e nenhuma mutação em VP1; cabe destacar que a mutação ocorreu na posição 525 e não na posição 480. Nas 18 amostras estudadas, independentes de mutações em VP1 e 5'NC, recombinação na região não estrutural do genoma não foi detectada.

Para o sorotipo 2, das 20 amostras estudadas em conjunto, 14 apresentaram mutações na região da VP1 e, destas, nove apresentaram reversão em 5'NC. Cabe destacar que, todas as sete amostras que apresentaram a principal mutação associada à reversão de neurovirulência em VP1 apresentaram também a mutação na região 5'NC. Somente uma amostra apresentou mutação em 5'NC e nenhuma mutação em VP1. As amostras 24060 e 32254 apresentaram mutação em 5'NC, VP1 e recombinação na região 3D, com o poliovírus 1, o sorotipo recombinante.

Para o sorotipo 3, das 16 amostras analisadas em conjunto, 12 apresentaram mutações em VP1. Dessas 12, 11 apresentaram a principal reversão de neurovirulência em VP1 e a mutação no nt 472 da região 5'NC. A amostra 26667 deste grupo apresentou recombinação heterotípica.

Tabela 4.1: Amostras analisadas nas regiões 5'NC, VP1, 2C e 3D do genoma de poliovírus tipo 1.

<b>PV1</b>						
<i>Registro</i>	<i>estado</i>	<i>ano</i>	<i>5'NC</i>	<i>mutações em VP1</i>	<i>mutações não sinônimas</i>	<i>2C+3D</i>
20241	BA	1995	-	0	-	P1 regular
22673	PR	1996	-	0	-	P1 regular
22983	BA	1996	-	0	-	P1 regular
22986	AL	1996	-	0	-	P1 regular
23233	AL	1996	-	0	-	P1 regular
23235	AL	1996	-	0	-	P1 regular
23246	BA	1996	-	0	-	P1 regular
23601	BA	1997	-	3	<i>A88T, I90M</i>	P1 regular
23947	GO	1997	<b>G480A</b>	1	<b>T106A</b>	P1 regular
24189	CE	1997	<b>T525C</b>	0	-	P1 regular
25519	CE	1999	<b>G480A</b>	3	0	P1 regular
25520	CE	1999	<b>G480A</b>	3	0	P1 regular
26432	SC	2000	-	0	-	P1 regular
26861	PA	2000	<b>G480A</b>	2	<i>I90L, T106A</i>	P1 regular
32560	PA	2004	-	0	-	P1 regular
32688	SP	2004	-	0	-	P1 regular
32796	RJ	2004	-	0	-	P1 regular
32798	RJ	2004	-	0	-	P1 regular

A tabela apresenta os resultados do sequenciamento das regiões VP1 e 5'NC e a presença de recombinação nas regiões 2C e 3D. A coluna "5'NC" mostra a presença, ou não, de mutação na posição 480. A coluna "mutações (VP1)" indica o número de mutações encontradas no gene que codifica a VP1. O destaque na cor rosa informa a presença de mutação G2795A. Na coluna "mutação não sinônimas" as mudanças de aa e as posições que ocupam na VP1 são apresentadas. A coluna "2C+3D" apresenta os resultados das análises nas duas regiões 2C/3D em relação à recombinação. Os traços indicam que não existem diferenças entre a cepa vacinal e a amostra analisada.

Abreviaturas de nucleotídeos: A, adenina; C, citosina; G, guanina; T, timina. Abreviaturas de resíduo de aminoácidos: A,alanina; I, isoleucina; L, leucina; M, metionina; T, treonina.

Tabela 4.2: Amostras analisadas nas regiões 5'NC, VP1, 2C e 3D do genoma de poliovírus tipo2.

<b>PV2</b>						
<b>Registro</b>	<b>estado</b>	<b>ano</b>	<b>5'NC</b>	<b>mutações em VP1</b>	<b>mutações não sinônimas</b>	<b>2C+3D</b>
22300	RJ	1996	<b>A481G</b>	1	<b>I143T</b>	P2 regular
22437	PE	1996	-	0		P2 regular
22555	PA	1996	<b>A481G</b>	1	<b>I143T</b>	P2 regular
22984	PE	1996	<b>A481G</b>	4		P2 regular
22985	PB	1996	-	0		P2 regular
24060	AP	1997	<b>A481G</b>	3	<b>I143T</b>	P2 3D(P1)
29151	SP	2002	<b>A481G</b>	2	<b>I143T</b>	P2 regular
29539	MA	2002	<b>A481G</b>	2		P2 regular
29540	MA	2002	<b>A481G</b>	2	<b>I143T</b>	P2 regular
31000	BA	2003	-	0		P2 regular
31172	RJ	2003	<b>A481G</b>	1		P2 regular
32254	MG	2004	<b>A481G</b>	11	<i>P21L,I143T, I157V, N171D,A218T</i>	P2 3D(P1)
32545	PR	2004	-	2		P2 regular
32598	SP	2004	-	1		P2 regular
32855	SC	2004	<b>A481G</b>	0		P2 regular
32856	SC	2004	<b>A481G</b>	1		P2 regular
33101	MG	2005	-	1		P2 regular
33705	PA	2005	<b>A481G</b>	0		P2 regular
34092	SP	2005	-	3	<b>I143T</b>	P2 regular
34234	RS	2005	<b>A481G</b>	0		P2 regular

A tabela apresenta os resultados do sequenciamento das regiões VP1 e 5'NC e a presença de recombinação nas regiões 2C e 3D. A coluna "5'NC" mostra a presença, ou não, de mutação na posição 481. A coluna "mutações (VP1)" indica o número de mutações encontradas no gene que codifica a VP1; o destaque na cor rosa informa a presença de mutação T2909C. Na coluna "mutação não sinônimas" as mudanças de aa e as posições que ocupam na VP1 são apresentadas. A coluna "2C+3D" apresenta os resultados das análises nas duas regiões 2C/3D em relação à recombinação. Os traços indicam que não existem diferenças entre a cepa vacinal e a amostra analisada.

Abreviaturas de nucleotídeos: A, adenina; C, citosina; G, guanina; T, timina. Abreviaturas de resíduo de aminoácidos: A, alanina; C, cisteína; F, Fenilalanina; H, histidina; I, isoleucina; L, leucina; M, metionina; S, serina; T, treonina; Y, tirosina; P, prolina ;V, valina.

Tabela 4.3: Amostras analisadas nas regiões 5'NC, VP1, 2C e 3D do genoma de poliovírus tipo 3.

PV3						
Registro	estado	ano	5'NC	mutações em VP1	mutações não sinônimas	2C+3D
20242	RN	1995	T472C	4	T06I, T15A, A54V	P3 regular
20246	AL	1995	-	3	T06I, S293P	P3 regular
22910	PA	1996	T472C	4	T06I, A54V	P3 regular
22947	PA	1996	T472C	0	-	P3 regular
22948	MA	1996	T472C	1	T06I	P3 regular
23239	BA	1996	T472C	1	T06I	P3 regular
23240	PB	1996	T472C	1	T06I	P3 regular
23332	PA	1997	T472C	0	-	P3 regular
25865	SC	1999	-	1	0	P3 regular
26667	SP	2000	T472C	2	T06I	<b>Rec (EVNP)</b>
30715	SP	2003	T472C	5	T06I, A54V, K212R, I258V	P3 regular
30745	RJ	2003	T472C	2	T06I	P3 regular
32233	SC	2004	-	0	-	P3 regular
33103	RS	2005	T472C	2	T06I, A54V	P3 regular
33635	MS	2005	T472C	2	T06I, A54V	P3 regular
36676	ES	2007	T472C	2	T06I, A54V	P3 regular

A tabela apresenta os resultados do sequenciamento das regiões VP1 e 5'NC e a presença de recombinação nas regiões 2C e 3D. A coluna "5'NC" mostra a presença, ou não, de mutação na posição 472. A coluna "mutações (VP1)" indica o número de mutações encontradas no gene que codifica a VP1, o destaque na cor rosa informa a presença de mutação T2493C. Na coluna "mutação não sinônimas" as mudanças de aa e as posições que ocupam na VP1 são apresentadas. A coluna "2C+3D" apresenta os resultados das análises nas duas regiões 2C/3D em relação à recombinação. O resultado marcado com um retângulo vermelho apresentou recombinação nas regiões 2C e 3D com enterovírus diferente do poliovírus. Os traços indicam que não existem diferenças entre a cepa vacinal e a amostra analisada.

Abreviaturas de nucleotídeos: A, adenina; C, citosina; G, guanina; T, timina. Abreviaturas de resíduo de aminoácidos: A, alanina; I, isoleucina; K, lisina; P, prolina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina.

## 5. DISCUSSÃO

Um problema encontrado em pesquisas relacionadas aos poliovírus isolados de casos de PFA está na possibilidade, bastante frequente, de serem isolados mais de um sorotipo de poliovírus em uma mesma amostra analisada. Durante a escolha inicial das amostras foram excluídos os casos de mistura de poliovírus para se evitar interferência de mais de um sorotipo nas análises. Na rotina do diagnóstico, as misturas foram sequenciadas e apenas amostras cujo resultado do seqüenciamento fosse estritamente relacionado ao sorotipo que apresentava o maior número de partículas virais foram incluídas no estudo. Quanto à análise da recombinação genômica nas regiões 2C e 3D, a presença de misturas de segmentos genômicos dificultou a interpretação adequada dos resultados (amplificações) obtidos neste estudo.

Com o aumento do número de surtos de c-PVDV no mundo, surgiu a necessidade de avaliarmos todos os sorotipos de poliovírus, mesmo aqueles presentes em misturas, considerando que a caracterização de um poliovírus como PVDVs é fornecida pelo número de mutações identificadas a partir da comparação com as cepas vacinais de referência. Para isto foi desenhado um conjunto de “primers” que pudesse amplificar seletivamente cada um dos poliovírus presentes nas misturas. Várias amostras de misturas de sorotipos de poliovírus foram testadas e como o resultado atendeu a proposta do experimento, as amostras com isolamento de mais de um sorotipo passaram, então, a ser analisadas a partir de 2009. Os resultados deste trabalho foram apresentados no XXI Congresso de Virologia e o manuscrito encontra-se em fase de preparação, embora, no presente momento, este tipo de análise ainda não possa ser realizada pelos laboratórios de referência da OMS para poliomielite nas diferentes regiões do Mundo.

Em 2010, uma mistura de poliovírus 1 e poliovírus 3 foi isolada e seus sorotipos foram subsequentemente sequenciados individualmente e ambos sorotipos apresentaram um número de mutações superior à média observada, fato que sinaliza um possível caso de PVDV ligado à imunodeficiência (dados não apresentados). Com o objetivo de uma investigação mais detalhada do caso, estes resultados foram informados à Vigilância Epidemiológica das PFAs (COVER).

A vacina Sabin, durante o teste de campo realizado em larga escala, por ocasião do seu licenciamento, apresentou um excelente resultado e foi aprovada para ser distribuída mundialmente no início dos anos 1960. O licenciamento foi sequencial, com a cepa Sabin 1, de menor neuropatogenicidade, aprovada em agosto de 1961, a cepa Sabin 2, em outubro de 1961 e a Sabin 3, em março de 1962. O licenciamento da Sabin 3 foi adiado em decorrência

de sua indesejável instabilidade genética e de sua relativa baixa imunogenicidade. Inicialmente a VOP foi administrada na forma monovalente, mas testes de campo realizados no Canadá levaram ao licenciamento da formulação trivalente em 1963. Diante do grande número de surtos e da elevada incidência de casos associados com paralisia nos anos de 1950, houve grande urgência na liberação das vacinas e, assim, somente duas décadas, após o licenciamento da VOP, investigações sistemáticas, em relação às bases moleculares do processo de atenuação, tiveram início.

A instabilidade genética da VOP foi a maior preocupação antes e depois do licenciamento. Com o objetivo de minimizar o acúmulo de mutações responsáveis pela reversão à neurovirulência, os produtores da VOP vêm utilizando processos extremamente controlados em sua fabricação, com sistemática testagem de todos os lotes quanto à neuropatogenicidade em macacos e à sensibilidade térmica.

Métodos filogenéticos são úteis para estimar relações de ancestralidade e descendência entre organismos. Os poliovírus sequenciados e analisados nesse trabalho foram isolados a partir de pacientes apresentando quadros de PFA ocorridos no Brasil no período pós-eliminação dos poliovírus selvagens. Estes dados ainda não haviam sido avaliados, fato que torna o presente trabalho inédito no campo da saúde pública.

Nas 70 amostras de PV1, analisadas pelo do sequenciamento da VP1, 66% possuíam 100% de identidade com a cepa vacinal Sabin e a análise filogenética, pelo algoritmo NJ, permitiu visualizar a presença de alguns ramos diretamente relacionados ao número de mutações. Duas mutações (transversões) associadas à neurovirulência no nt 2795 (A→G) e no nt 2879 (T→C) dos PV1 foram identificadas: sete amostras na posição nt 2795 e uma amostra para a posição nt 2879, dentre as analisadas. Na parte superior da árvore, encontra-se o ramo que possui a mutação (2795) associada ao fenótipo selvagem assim como no resultado da análise na rede de haplótipos. Não observamos grupos associados com a região geográfica ou ao ano de ocorrência do caso de PFA.

O sorotipo 1 é o mais estável dos três sorotipos vacinais. Este fato possivelmente pode ser explicado porque as diferenças nucleotídicas, distribuídas ao longo de todo o genoma, entre a cepa Sabin 1 e a cepa selvagem (Mahoney), que lhe deu origem, é bastante acentuada com 57 substituições nucleotídicas. Seis das 57 mutações estão localizadas na região 5'NC, 49 na região codificante (21 levando a troca de aas) e duas substituições localizadas na região 3'NC (Kew et al. 2005). A comparação das representações gráficas das redes de haplótipos de forma proporcional à identidade das sequências para os três sorotipos no presente estudo reforça a observação de diversos autores quanto à estabilidade do sorotipo 1 no gene VP1 (revisto por Kew et al. 2005).

Com a complementação da análise pela rede de haplótipos foi possível visualizar a frequência, a natureza (sinônimas e não sinônimas) e a localização das mutações. A rede de haplótipos e sua representação gráfica permitiram a evidência da principal característica observada no estudo deste sorotipo: a reduzida frequência de substituições nucleotídicas apresentada pelos PV1.

O sequenciamento nucleotídico da VP1, nas amostras vacinais do sorotipo 2, permitiu a observação de um perfil de estabilidade intermediário em relação aos sorotipos 1 e 3, quando analisada a posição considerada como crítica à neurovirulência (nt 2909) em VP1. Os resíduos nt 2908, 2909 e 2910 pertencem ao triplete que codifica o resíduo de aminoácido 143 em VP1. O fenótipo vacinal apresenta uma Isoleucina (I) enquanto que o fenótipo selvagem possui Treonina (T) (transversão T→C). Essa substituição foi observada em 15 das 53 amostras analisadas (28%). Em relação a este resíduo de aa (143) foi verificado, curiosamente, que outras seis amostras apresentaram a transição no nt 2909 de T→A, o que levou a uma substituição do aa Isoleucina (I) para Asparagina (N). Ainda relativo ao mesmo resíduo de aa (143), em três amostras foram observadas mutações de transversão (A→G) e transição (A→T), na posição nt 2908 que geraram troca da Isoleucina (I) para Valina (V) e Fenilalanina (F), respectivamente. O resíduo de aminoácido 143, que na cepa de referência vacinal 2 apresenta Isoleucina, em 45% das amostras foi substituído por Valina, Treonina, Asparagina ou Fenilalanina. Resultados semelhantes foram relatados por Pliaka e colaboradores (2007) que verificaram que 54% das 11 amostras analisadas, procedentes de quatro pacientes saudáveis e de dois, de VAPP, tinham o aa Isoleucina substituído por Valina, Asparagina e Treonina. A localização deste resíduo interage próximo ao sítio de neutralização e, possivelmente, pode influenciar na fase inicial da infecção (Pliaka et al. 2007). Os dois casos de PVDV identificados apresentaram a substituição neste resíduo de aa; as amostras 24397 e 24398 com a substituição para o aa Asparagina e a amostra 32254, para Treonina, como, caracteristicamente, ocorre no fenótipo selvagem.

O sorotipo 2 foi o que apresentou o maior número de substituições nucleotídicas na VP1, chegando a 11 mutações, enquanto que os sorotipos 1 e 3 apresentaram até cinco mutações. Este fato levou a identificação de dois casos de isolamento de PVDV, um no estado do Paraná e o outro, no estado de Minas Gerais. Os parâmetros, determinados internacionalmente e adotados pela OMS, classificam como PVDV a amostra que apresentar 10 ou mais diferenças nucleotídicas no gene que codifica a VP1 para os três sorotipos. Em 1998, o estado do Paraná enviou duas amostras de fezes de um caso de PFA e ambas as amostras mostraram ser PVDV; o caso de PVDV de Minas Gerais ocorreu em 2005. É possível que estes casos estejam relacionados a crianças com comprometimento imunológico,

pois não foram detectados outros casos no mesmo período. Uma nova amostra do caso de Minas Gerais foi coletada, enviada ao LEV em 2010, mas não foi possível o isolamento viral.

Na 16<sup>a</sup> Reunião Informal para a Rede Global de Laboratórios de Pólio, em setembro de 2010 em Genebra, o número de mutações, de 10 ou mais, foi reduzido para seis ou mais em relação ao sorotipo 2. Para os sorotipos 1 e 3 continua mantido o parâmetro anterior de 10 ou mais mutações na VP1. O sorotipo 2 tem sido o responsável pela maioria dos surtos de cPVDV ocorridos mundialmente e também tem sido o sorotipo predominante em casos do iPVDV (WHO 2010d, GPEI homepage em 25-03-11).

Para o sorotipo 3 foram analisadas, pelo sequenciamento nucleotídico, 54 amostras Sabin e observados dois aspectos que confirmam dados anteriormente publicados (revistos por Kew et al. 2005): i) a presença de uma maior variabilidade genética em comparação com os sorotipos 1 e 2 e, ii) a mutação em VP1 na posição 2493, considerada crítica na reversão da neurovirulência, em 40 das 54 amostras analisadas.

Dos 3 sorotipos de poliovírus vacinal, o menos estável geneticamente é o poliovírus tipo 3, o que pode ser percebido devido à maior incidência de casos associados à vacina (VAPP) em crianças vacinadas. A indústria farmacêutica Pfizer modificou a cepa Sabin 3 de sua formulação tornando-a mais estável e menos neurovirulenta (Kew et al. 2005). Amostras dos três sorotipos de poliovírus analisados apresentaram mutações associadas à de reversão da neurovirulência, em VP1, ocasionando troca de aminoácidos, porém com perfis de substituições bem diferentes. Para o sorotipo 1, um conjunto único com poucas amostras substituídas para o resíduo do aa 106; para o sorotipo 2, a observação de dois conjuntos, com o maior sem a substituição do resíduo do aa 143, e para o sorotipo 3, a presença de três conjuntos, com o de menor tamanho, na ausência de substituição do aa 06.

Não obstante a análise da região 5'NC ser muito útil para complementação dos dados obtidos no estudo de VP1, a mesma foi incluída em nossos estudos considerando fundamentalmente os diversos relatos anteriores, principalmente nas décadas de 1980 e 1990, que descrevem a importância desta região do genoma sob o aspecto da neurovirulência. Para muitos autores, as substituições nucleotídicas nas posições 480, 481 e 472 para os sorotipos 1, 2 e 3, respectivamente, são consideradas as principais causas de reversão à neurovirulência (Cann et al. 1984, Evans et al. 1985, Westrop et al. 1989, Ren R et al. 1991, Bouchard et al. 1995, Laassri et al. 2006).

A partir da publicação, em 1982, da sequência completa do genoma do poliovírus tipo 1-Sabin, por Nomoto e colaboradores (1982), as posições críticas de substituições associadas à neurovirulência, começaram a ser conhecidas. Estudos de Cann e colaboradores (1984), realizados diretamente na cepa semente da vacina Sabin 3 (Leon 12a1b) e em duas

preparações, oriundas de lotes de vacina comerciais, confirmaram que as sequências continham “U” na posição 472, o esperado para o fenótipo atenuado, enquanto que o nt C está presente no fenótipo selvagem. Estudos posteriores do próprio autor sugerem que esta posição possui um efeito direto na capacidade do vírus de se replicar no trato gastrointestinal humano e pode ter implicações na estrutura secundária do RNA. Em 1985, já tinha sido evidenciada a possibilidade das vacinas atenuadas contra a poliomielite, utilizadas globalmente, reverterem ao fenótipo neurovirulento. Nkowane e colaboradores (1987) publicaram um estudo de casos de VAPP nos Estados Unidos no período de 1973 a 1984, indicando que estes casos estavam principalmente, associados aos sorotipos 2 e 3 e, raramente, ao sorotipo 1. Evans e colaboradores (1985) estudaram isolados do sorotipo 3 de casos de VAPP e reportaram o padrão consistente da reversão, após a replicação no trato gastrointestinal humano. Esta observação foi atribuída, pelos autores, posteriormente confirmada por Kew e colaboradores (2005), a um visível aumento da neurovirulência dos poliovírus.

Estudos realizados por Laassri e colaboradores (2006) sugerem que este tipo de mutação afeta seletivamente a inicialização da tradução da poliproteína nas células de origem neural. O grupo também investigou casos de VAPP e os mesmo achados de Evans em 1985 foram observados, porém a reversão em pacientes saudáveis levou a sugestão de que fatores ligados ao hospedeiro teriam um importante papel na ocorrência de efeito adverso da vacina.

No presente estudo, não foi possível fazer a associação direta entre os isolados de poliovírus, contendo mutações em posições chaves e os casos de efeito adverso da vacina VOP, pois os dados relativos aos casos VAPP no Brasil não estão disponíveis. A classificação final de um VAPP é dada por uma comissão de especialistas denominada “Comissão Nacional de Revisão de Casos de Poliomielite” que se reúne anualmente para avaliar os casos que apresentaram os indicadores necessários e todos estes dados ficam sob a responsabilidade do setor de Vigilância Epidemiológica das PFAs no MS.

Os resultados encontrados para três sorotipos mostram que: i) 18,5% das amostras do sorotipo 1 apresentaram reversão na posição nt 480, ii) 65% das amostras do sorotipo 2 apresentaram reversão na posição nt 481 e iii) 81% das amostras do sorotipo 3, no nt 472. Estes resultados estão de acordo com estudos internacionais que indicam que o sorotipo 3 é o mais instável, seguido do sorotipo 2 e do sorotipo 1 (Kew et al. 2005).

Considerando que o aparecimento de mutações em posições de atenuação é o primeiro passo para a reversão e aquisição de propriedades biológicas relacionadas ao fenótipo selvagem, que ocorre diante de uma prolongada circulação dos poliovírus vacinais derivados (PVDV), estes PVDVs, além de compartilharem com os poliovírus selvagens o grau de divergência genética em relação à cepa Sabin, eles também compartilham a propriedade mais

importante, que é a de causar paralisia em humanos. Essa propriedade foi observada em todos os cPVDV e em vários iPVDV. Esta neurovirulência adquirida pelos PVDVs pode levar a pequenos surtos como o ocorrido em diversos países, como os documentados nas Filipinas, Hispaniola, Madagascar, China e Laos nos períodos de 2000 a 2005 (Kew et al. 2005).

Os PVDV se constituem no principal obstáculo à manutenção da erradicação da poliomielite em países livres dos poliovírus selvagens e que utilizam a vacina oral contra a poliomielite, como é o caso do Brasil, onde, até recentemente, nenhum caso de PVDV tem sido identificado. A identificação neste estudo de três amostras de PVDV2, nos estados do Paraná e de Minas Gerais, alerta para a importância e para a necessidade de que altas taxas de cobertura vacinal sejam mantidas assim como a vigilância epidemiológica e laboratorial dos casos de PFA. Como mais de 95% das infecções pelos poliovírus ocorrem de forma inaparente, sendo os vírus excretados ao meio ambiente, após a replicação intestinal, a implementação da vigilância ambiental se constitui de ferramenta estratégica de grande importância para o monitoramento da circulação dos poliovírus na ausência de casos clínicos.

Um fato que tem sido observado em cPVDV e iPVDV é a recombinação genética nas regiões 2C e 3D. A ocorrência deste evento foi inicialmente observada nos poliovírus, considerados como protótipos dos enterovírus entre os Picornavirus, com, posterior identificação também em outros gêneros dentro da família *Picornaviridae* (Oberste et al. 2003).

Teoricamente, a recombinação é um mecanismo evolutivo mais eficiente do que a mutação em decorrência da transferência de um número de propriedades do vírus original para o vírus receptor, em um único evento. A presença de populações variantes de poliovírus no trato intestinal proporciona, assim, uma abundância de material para permitir uma seleção de variantes com maior capacidade de replicação (Egger & Bienz 2002).

Eventos de recombinação têm sido mostrados, com frequência em PV de forma natural. Indivíduos vacinados com VOP trivalente têm apresentado recombinação intertípica, envolvendo os três sorotipos de PV (tipo 1, 2 e 3) (Cammack et al. 1988; Minor et al. 1986b; Savolainen-Kopra et al. 2009). As recombinações envolvendo regiões do capsídeo são fenômenos mais raros, mas, as recombinações envolvendo regiões genômicas, que não codificam para as proteínas do capsídeo (ex: protease 2C, polimerase 3D), ocorrem naturalmente com os diferentes sorotipos de poliovírus ou mesmo entre poliovírus e os enterovírus não poliovírus (EVNP) (Kew et al. 1995).

É pertinente considerar que por ser uma vacina trivalente, a VOP oferece condições favoráveis para que ocorram múltiplas infecções nas células-alvo no intestino humano, o que leva a uma possibilidade de recombinação entre os genomas dos diferentes sorotipos dos

poliovírus identificadas como recombinações intertípicas como já registrado por Dahourou e colaboradores em 2002. Uma outra possibilidade de recombinação tem sido detectada na maioria dos surtos causados por cPVDV, na qual é possível observar que a recombinação ocorre com outros enterovírus diferentes dos poliovírus, geralmente pertencentes à espécie C (recombinação heterotípica). Por fim, um terceiro tipo de recombinação tem ocorrido em países onde os poliovírus do fenótipo selvagem são ainda endêmicos, evento que aumenta a possibilidade de recombinação de um mesmo sorotipo com fenótipos diferentes, isto é, um sorotipo selvagem com um vacinal homólogo.

Dentre as amostras já analisadas, encontramos recombinações entre sorotipos diferentes de poliovírus vacinais e também uma amostra recombinada com um genoma diferente dos poliovírus (recombinação heterotípica).

O estudo pela RT-PCR, utilizando uma reação duplex para as regiões 2C e 3D, levou a achados que divergem, em porcentagem, em relação ao trabalho de Melnick (1996), porém apresenta concordância em relação ao perfil de recombinação de cada sorotipo de poliovírus. Dentre as 222 amostras analisadas para 2C e 3D, encontramos 15 recombinantes, com 1,3% para PV1, 6,6% para PV2 e 13,2% para PV3. Estes resultados corroboram os achados de Melnick (1996), embora em porcentagens inferiores. Melnick verificou a frequência das recombinações heterotípicas e seu impacto na neurovirulência de cepas vacinais após a replicação intestinal, usando um método de análise combinatória de dois segmentos polimorfos distantes de um genoma viral, um na proteína do capsídeo que codifica VP1 e um outro, na região que codifica a 3 D-polimerase. Apenas uma amostra de PV3 dentre todas analisadas apresentou recombinação heterotípica com EVNP, amostra esta provavelmente pertencente à espécie C (HEV-C) nas regiões 2C e 3D. Este achado não é surpreendente, uma vez que os PV pertencem à mesma espécie (Stanway et al. 2005). Embora o trabalho de Melnick tenha encontrado uma porcentagem maior de amostras recombinantes (0% para PV1, 49% para PV2 e 68% para PV3), o número total de poliovírus estudados foi de apenas 70, enquanto o presente estudo envolveu 222 amostras.

Para finalizar, os resultados combinados das análises das quatro regiões do genoma, de 44 amostras dos três sorotipos de poliovírus possibilitaram indicar um mesmo perfil de estabilidade da análise individual de cada região. Em todas as regiões do genoma, a maior instabilidade foi observada no sorotipo 3, seguido no sorotipo 2 e por último, no sorotipo 1, o de maior estabilidade. Fatos históricos acerca do processo de atenuação, assim como os inúmeros estudos já realizados, nos permitem classificar e inserir os resultados encontrados com as amostras do Brasil de 1995 a 2007, incluídas neste estudo, nos mesmos perfis descritos previamente ao longo, no mínimo, das cinco últimas décadas. Desta forma,

acreditamos que o presente estudo, estrategicamente, possa contribuir para pesquisas futuras assim como para ações necessárias e eficazes a serem levadas a efeito após a Erradicação Global da Poliomielite, erradicação esta que, esperamos e desejamos, ocorra em um futuro bem próximo.

## 6. CONCLUSÕES

- 1) A partir do sequenciamento nucleotídico do gene que codifica a principal proteína do capsídeo (VP1) foi possível detectar, pela primeira vez, dois casos de poliovírus do sorotipo 2 derivados da vacina isolados de casos de paralisia flácida aguda no Brasil, provavelmente relacionados a indivíduos imunodeficientes.
- 2) Os três sorotipos de poliovírus vacinais mostraram ser geneticamente instáveis quando analisados nas posições 2795 (PV1), 2909 (PV2) e 2493 (PV3), do gene VP1, associadas à reversão da neurovirulência. A frequência de amostras mutadas observada para os três sorotipos, foi: PV3<sub>2493</sub> (74% mutados), PV2<sub>2909</sub> (28% mutados) e PV1<sub>2795</sub> (10% mutados).
- 3) A análise filogenética indicou que o número ou a posição das substituições nucleotídicas associadas à reversão a neurovirulência em VP1 não estavam relacionadas a um padrão geográfico ou temporal.
- 4) Na análise para os nucleotídeos (nt 480, 481, 472) presentes na região 5'NC, considerados os principais pontos associados à reversão de neurovirulência, para os sorotipos 1, 2 e 3, respectivamente, o PV3<sub>472</sub> apresentou maior instabilidade (81% das amostras com reversão), seguido pelo PV2<sub>481</sub> (65% das amostras com reversão) e o PV1<sub>480</sub> (18.5% das amostras com reversão).
- 5) Os poliovírus sorotipo 3 demonstraram maior instabilidade genética nas regiões 2C e 3D e o único sorotipo a apresentar recombinação genética com outros enterovírus que não os poliovírus. Os poliovírus sorotipo 2 não apresentaram recombinação na região 2C e o sorotipo 1 mostrou ser o mais estável dos três sorotipos.
- 6) A análise da estabilidade genética nas quatro regiões genômicas analisadas dos poliovírus vacinais, isolados de casos de PFA no Brasil, no período de 1995 a 2007, apresentou perfis distintos entre os três sorotipos, sendo que o mais estável o PV1 seguido pelo PV2 e por último o PV3.
- 7) A rede de haplótipos apresentou uma melhor visualização dos perfis genéticos das amostras quando comparada a árvore filogenética obtida pelo algoritmo NJ. Na rede de haplótipos foi possível identificar i) os subgrupos formados a partir da mutação associada à reversão de neurovirulência, ii) o padrão de distribuição das mutações na VP1 e iii) localizar as mutações de transição e transverso, assim como as não sinônimas.

## **7. PERSPECTIVAS**

- a) A OMS , nos últimos anos, vem investindo em treinamento e equipamentos para uma resposta mais rápida quanto ao diagnóstico dos enterovírus/poliovírus. O LEV muito brevemente adotará a metodologia de PCR em tempo real em substituição a PCR convencional.
- b) Utilizando reagentes (primers) desenhados e testados no LEV, amostras com misturas de sorotipos de poliovírus serão sequenciadas aumentando a investigação da instabilidade genética para casos de PFA.
- c) Implementação da Vigilância dos Poliovirus em amostras ambientais, a qual, tem sido fortemente sugerida pela OMS principalmente pelo quadro assintomático apresentado na poliomielite em mais de 90% dos indivíduos.
- d) Trabalhos colaborativos para pesquisa de enterovírus e poliovírus em grupos indígenas, que pelo isolamento geográfico, são potencialmente suscetíveis para os poliovirus.

## **8. BIBLIOGRAFIA**

- 1** Agol VI, Paul AV, Wimmer E 1999. Paradoxes of the replication of picornaviral genomes. *Virus Research* 62: 129-147
- 2** Bailly JL, Cardoso MC, Labbé A, Peigue-Lafeuille H 2004. Isolation and identification of an enterovirus 77 recovered from a refugee child from Kosovo, and characterization of the complete virus genome. *Virus Research* 99: 147–155.
- 3** Baltimore D 1969. The replication of picornavirus. In: *The biochemistry of viruses*. Marcel Dekker, Levy Publisher: 101-176.
- 4** Baltimore D, Girard M 1966. An intermediate in the synthesis of poliovirus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 56: 741-746.
- 5** Bittle JL, Avampato J, Amundsen SM and Vickers JH 1966. Results of testing production lots of oral poliovirus vaccine. *The Journal of Infectious Diseases* 116: 215-220.
- 6** Bouchard MJ, Lam DH and Racaniello VR 1995. Determinants of attenuation and temperature sensitivity in the type 1 poliovirus Sabin strain. *The Journal of Virology*. 69: 4972–78
- 7** Campos ALV, de Nascimento DR, Maranhão E 2003. A história da poliomielite no Brasil e seu controle por imunização. *História, Ciências, Saúde. Manguinhos*, 10: 573-600.
- 8** Cann AJ, Stanway G, Hughes PJ, Minor PD, Evans DMA, Schild GC, Almond JW 1984. Reversion to neurovirulence of the live-attenuated Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. *Nucleic Acids Research* 12: 7787-7792.
- 9** Caro V, Guillot S, Delpeyroux F, Crainic R 2001. Molecular strategy for ‘serotyping’ of human enteroviruses. *Journal of General Virology* 82: 79–91.
- 10** Carvalho LHF, Weckx LY 2006. Universal use of inactivated polio vaccine. *Jornal de Pediatria*. 82: 75-82.
- 11** Clement M, Posada D, Crandall KA 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1660.
- 12** Committee on Enteroviruses 1962. Classification of human enteroviruses. *Virology* 16: 501–504.

- 13 Committee on the Enteroviruses 1957. The enteroviruses. *American Journal of Public Health* 47: 1556–1566
- 14 da Silva, EE, Costa, EV ; Azevedo JPR. Enteroviroses de Importância Médica. In: José Rodrigues Coura (Org.). *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, v. 2, p. 1681-1700.
- 15 Diament AJ, Kok F 1991. Poliomielite. In: *Doenças Infecciosas e parasitárias*. Veronesi, R. 8<sup>a</sup> ed.: 71-77.
- 16 Dowdle W and Birmingham ME 1997. Biologic Principles of Poliovirus Eradication. *Journal of Infection Disease*. 175 S1: 286-92.
- 17 Drake JW 1993. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 4171–4175.
- 18 Egger D, Bienz K 2002. Recombination of poliovirus RNA probes proceeds in mixed replication complexes originating from distinct replication start sites. *Journal of Virology* 76: 10960-10971.
- 19 Enders JF, Weller TH, Robbins FC 1949. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissue. *Science* 109: 85-87.
- 20 Enders JF, Weller TH, Robbins FC 1952. Alterations in pathogenicity for monkeys of Brunhilde strain of poliovirus following cultivation in human tissues. *Federation Proceedings* 11: 467.
- 21 Evans DMA, Dunn G, Minor PD, Schild GC, Cann AJ, Stanway G, Almond JW, Currey K, Maizel Jr JV 1985. Increased neurovirulence associated with a single nucleotide change in a noncoding region of the Sabin type 3 poliovaccine genome. *Nature* 314: 548-550.
- 22 Fauquet CM, Fargette D 2005. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology Journal*, 2: 64.
- 23 Gmyl AP, Agol VI 2005. Diverse Mechanisms of RNA Recombination. *Molecular Biology*, 39: 529-542.
- 24 GPEI (Global Polio Eradication Initiative) 2010. Global Post-eradication IPV Supply and Demand Assessment: Integrated Findings  
<http://www.polioeradication.org/Portals/0/Document/Resources/SupplyLandscapeEconomics.09.06.2010.pdf>

- 25 GPEI (Global Polio Eradication Initiative) 2008. Strategic Plan 2009-2013 Framework document.
- 26 GPEI Homepage (<http://www.polioeradication.org>)
- 27 Halstead LS. Acute polio and post-polio syndrome. In: Halstead LS and Grimby G, eds. Post Polio Syndrome. Philadelphia: Hanley and Belfus Inc. 1998: 99-214.
- 28 Hellen CUT, Wimmer E 1995. Enterovirus structure and assembly. In: Human Enterovirus Infections, American Society for Microbiology. Haley A. Rotbart Publishers: 155-174.
- 29 Hogle JM, Chow M, Filman DJ 1985. The three dimensional structure of poliovirus at 2,9 A resolution. *Science* 229: 1358-1365.
- 30 Hogle JM, Filman DJ 1989. The antigenic structure of poliovirus. *Philosophical Transactions Royal Society.* 323: 467-478.
- 31 Jubelt B, Gallez-Hawkins G, Narayan O 1980. Pathogenesis of human poliovirus infection in mice. II. Age dependency of paralysis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.* 39: 149.
- 32 Kew O, Morris-Glasgow V, Landaverde M, Burns C, Shaw J, Garib Z, André J, Blackman E, Freeman CJ, Jorba J, Sutter R, Tambini G, Venczel L, Pedreira C, Laender F, Shimizu H, Yoneyama T, Miyamura T, van der Avoort H, Oberste MS, Kilpatrick D, Cochi S, Pallansch M, de Quadros C 2002. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine derived-poliovirus. *Science Reprint.* 292: 356 – 359
- 33 Kew OM, De L, Yang C, Nottay B, da Silva EE, Pallansch MA 1993. The role of virologic surveillance in the global initiative to eradicate poliomyelitis. In: Edouard Kurstak, *Control of Virus Diseases*, 2<sup>nd</sup> ed, New York, Marcel Dekker, Inc. p. 215 – 246.
- 34 Kew OM, Mulders MN, Lipskaya GY, Da Silva EE, Pallansch MA 1995. Molecular Epidemiology of polioviruses. *Seminars in Virology.* 6: 401-414.
- 35 Kew OM, Sutter RW, Gorville EM, Dowdle WR, Pallansch 2005. Vaccine-Derived Polioviruses and the Endgame Strategy for Global Polio Eradication. *Annual Review Microbiology.* 59: 587–635.

- 36** Kew OM, Sutter RW, Nottay BK, McDonough MJ, Prevots DR, Quick L, Pallansch MA 1998. Prolonged Replication of a Type 1 Vaccine-Derived Poliovirus in an Immunodeficient Patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 26: 2893–2899.
- 37** Kilpatrick DR, Ching K, Iber J, Campagnoli R, Freeman CJ, Mishrik N, Liu H-M, Pallansch MA, Kew OM 2004. Multiplex PCR Method for Identifying Recombinant Vaccine-Related Polioviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 4313–4315.
- 38** King AMQ, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypiä T, Knowles NJ, Lemon SM, Minor PD, Palmenberg AC, Skern T, Stanway G 2000. Picornaviridae. In "Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses". Eds Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Calisher, C.H., Carsten, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. and Wickner, R.B. Academic Press, New-York, San Diego, pp. 657-673.
- 39** Knowles NJ, Hovi T, Hyypiä T, King AMQ, Lindberg AM, Minor PD, Pallansch MA, Palmenberg AC, Skern T, Stanway G, Yamashita T, Zell R 2008. Taxonomy of Picornaviridae: Current Situation and Future Proposals. Disponível em: [http://www.picornastudygroup.com/posters/europic\\_2006.pdf](http://www.picornastudygroup.com/posters/europic_2006.pdf)
- 40** Laassri M, Lottenbach K, Belshe R, Rennels M, Plotkin S, Chumakov K 2006. Analysis of Reversions in the 5'-Untranslated Region of Attenuated Poliovirus after Sequential Administration of Inactivated and Oral Poliovirus Vaccines. *The Journal of Infectious Diseases* 2006; 193: 1344–1349.
- 41** Melnick JL 1996. Enteroviruses: poliovirus, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B and Straus SE. *Fields Virology* 1: 655-712. Third edition. New York. Lippincott-Raven Publishers.
- 42** Minor PD 1990. Antigenic structure of picornavirus. *Current Topics Immunology and Microbiology*. 161: 121-154.
- 43** Minor PD 1992. The molecular biology of poliovaccines. *Journal of General Virology*. 73: 3065–3077.
- 44** Minor PD 1993. Attenuation and reversion of the Sabin vaccine strains of poliovirus. *Developments in Biological Standardization*, 78: 17-26.
- 45** MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report) 1994. International Notes Certification of Poliomyelitis Eradication—the Americas, 43: 720-722.

- 46 MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report) 1997a. Paralytic poliomyelitis-United States, 1980-1994, 46: 79-83.
- 47 MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report) 1997b. Status of Global Laboratory Network for Poliomyelitis Eradication, 1994-1996, 46: 692-694.
- 48 MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report) 2000a. Developing and Expanding Contributions of the Global Laboratory Network for Poliomyelitis Eradication, 1997-1999, 49: 156-160
- 49 MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report) 2000b. Poliomyelitis Prevention in the United States Updated Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) 49(RR5): 1-22.
- 50 MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report) 2001a. Apparent global interruption of wild poliovirus type 2 transmission. 50: 222-224. Erratum, MMWR 2001 50: 249.
- 51 MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report) 2001b. Progress Toward Poliomyelitis Eradication --- South-East Asia, January 2000--June 2001; 50: 738-742.
- 52 MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report) 2003. Laboratory Surveillance for Wild and Vaccine-Derived Polioviruses, January 2002--June 2003; 52: 901-932.
- 53 MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report) 2006. Vaccine Preventable Deaths and the Global Immunization Vision and Strategy, 2006--2015; 55: 511-515.
- 54 MMWR ((Morbidity and Mortality Weekly Report) 2011. General Recommendations on Immunization. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) 60: 1-64
- 55 Modlin JF 1995. Poliomyelitis and Poliovirus Immunization. In: Human Enterovirus Infection, American Society for Microbiology. (ed. Haley A. Rotbart): 195-215.
- 56 Mohammed A. J., AlAwaidy S., Bawikar S., Kurup P.J., Elamir E., Shaban M.M.A., Sharif S.M, Avoort H.G.A.M., Pallansch, M. A., Malankar P., Burton A., Sreevatsava M. and Sutter R. W. 2010. Fractional Doses of Inactivated Poliovirus Vaccine in Oman. The New England Journal of Medicine 362: 2351-2359.
- 57 Molla A, Paul AV, Wimmer E 1991. Cell-free, de novo synthesis of poliovirus. Science; 254: 1647-1651.

- 58** Moore M, Morens DM 1984. Enteroviruses, including Polioviruses. In: Human Virology. (ed. Robert B. Belshe): 407-483.
- 59** MS (Ministério da Saúde) 1988. Bases Técnicas para a erradicação da transmissão autóctone da Poliomielite. Secretaria Nacional de Ações Básicas da Saúde. Grupo Executivo do Plano de ação para Erradicação da Poliomielite. 2<sup>a</sup> ed. Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde.
- 60** MS (Ministério da Saúde) 2003. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Imunizações 30 anos/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília: Ministério da Saúde. Série C. Projetos e Programas e Relatórios.
- 61** MS (Ministério da Saúde) 2009. Guia de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 7<sup>a</sup> ed. – Brasília: Ministério da Saúde 2009.
- 62** MS (Ministério da Saúde) Secretaria de Vigilância em Saúde 2003. Programa Nacional de Imunizações 30 anos/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília: Ministério da Saúde. Série C. Projetos e Programas e Relatórios.
- 63** MS (Ministério da Saúde) Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde 2008.
- 64** Mueller S, Wimmer E and Cello J 2005. Poliovirus and poliomyelitis: a tale of guts, brains, and an accidental event. *Virus Research*; 111: 175-193.
- 65** Nkowane B, Wassilak S, Orenstein W, Bart KJ, Schonberger LB, Hinman AR, Kew OM 1987. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis. United States: 1973 through 1984. *Journal of American Medical Association* 257: 1335–1340.
- 66** Nomoto A, Omata T, Toyoda H, Kuge, S, Horie, H, Kataoka Y, Genba Y, Nakano Y, Imura N 1982. Complete nucleotide sequence of the attenuated poliovirus Sabin 1 strain genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 79: 5793-5797.
- 67** Norder H, Bjerregaard L, Magnius L, Lina B, Aymard M, Chomel J.-J 2003. Sequencing of ‘untypable’ enteroviruses reveals two new types, EV-77 and EV-78, within human enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types. *Journal of General Virology*; 84: 827–836.

- 68** Nottay BK, Kew OM, Hatch MH, Heyward JT, Obijeski JF 1981. Molecular variation of type 1 vaccine-related and wild polioviruses during replication in humans. *Virology*; 108: 405-423.
- 69** Oberste MS, Maher K, Michel, SM, Belliot G, Uddin M, Pallansch MA 2005. Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species Human enterovirus A. *Journal of General Virology*; 86: 445-451.
- 70** Oberste MS, Maher, Pallansch MA 2003. Evidence for Frequent Recombination within Species Human Enterovirus B Based on Complete Genomic Sequences of All Thirty-Seven Serotypes. *Journal of Virology*; 78: 855–867.
- 71** Offit PA 2005. In *The Cutter Incident: how America’s first polio vaccine led to growing vaccine crisis*, 1<sup>st</sup> ed, printed in the United State of American by R.R. Donnelley & Sons.
- 72** Oliveira ASB, Quadros AAJ 2008. Síndrome pós-poliomielite (SPP): orientações para profissionais de saúde. Secretaria Estadual de Saúde do Governo de São Paulo. SES/SP, 2008.126 p;
- 73** Orsini M, de Freitas MRG, Reis CHM, Mello M, Porto F, Vaz AC, Silveira VC, Catharino AMS, Quintanilha G, Eigenheer JF, Carvalho LBC, Nascimento OJM 2010. Guia de Reabilitação Neurológica na Síndrome Pós-Poliomielite: Abordagem Interdisciplinar. *Revista Neurociencia*;18: 204-213.
- 74** Oxman M 1999. Enterovirus. In: *Tratado de Medicina Interna*, Bennet & Plum. 20<sup>a</sup> ed. Vol 1: 1968-1978.
- 75** PAHO (Pan American Health Organization) 1985. Director announces campaign to eradicate poliomyelitis from Americas by 1990. *Bulletin of the Pan American Health Organization*; 19: 213-215.
- 76** PAHO (Pan American Health Organization) 1994. *Polio Eradication Field Guide*, 2<sup>nd</sup> ed. pp.9-11. Washington.
- 77** Paul AV, Schultz A, Pincus SE, Oroszlan S, Wimmer E 1987. Capsid protein VP4 of poliovirus is N-myristolated. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 84: 7827-7831.
- 78** Paul JR 1971. *History of Poliomyelitis*. Yale University Press, New Haven, Conn.
- 79** PICORNAVIRUS homepage ([www.picornaviridae.com](http://www.picornaviridae.com)) acessada em 05-01-2011.
- 80** PICORNAVIRUS homepage ([www.picornaviridae.com](http://www.picornaviridae.com)) acessada em 26-06-2011.

- 81** Pipkin PA, Wood DJ, Racaniello VR, Minor PD 1993. Characterization of L cells expressing the human poliovirus receptor for the specific detection of poliovirus in vitro. *Journal of Virology Methods*; 41: 333-340.
- 82** Pliaka V, Dedepsidisa E, Kyriakopoulou Z, Papadopoulou I, Levidiotoub S, Markoulatos P 2007. Use of mutational pattern in 5'-NCR and VP1 regions of polioviruses for molecular diagnosis. *Molecular and Cellular Probes*; 21: 267–275.
- 83** Posada D, Crandall KA 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*; 14: 817-818.
- 84** Racaniello VR 1988. Poliovirus Neurovirulence. *Advances in Virus Research*; 34: 217-246.
- 85** Ren R, Moss EG, Racaniello VR 1991. Identification of two determinants that attenuate vaccine-related type 2 poliovirus. *Journal of Virology*; 65: 1377–1382.
- 86** Risi JB Jr 1984. The Control of Poliomyelitis in Brazil. *Reviews of infectious disease*. Vol. 6, Supplement 2. May-June 1984.
- 87** Roivainen M, Blomqvist S, al-Hello H, Paananen A, Delpeyroux F, Kuusi M, Hovi T 2010. Highly divergent neurovirulent vaccine-derived polioviruses of all three serotypes are recurrently detected in Finnish sewage. *Eurosurveillance* (15) 9. [www.eurosurveillance.org](http://www.eurosurveillance.org)
- 88** Rueckert RR 1996. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Fields B.N.; Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE. *Fields Virology* (ed. Lippincot-Raven); vol 1: 609-654. Lippincot-Raven Publishers.
- 89** Sabin, A. B. 1956. Present status of attenuated live-virus poliomyelitis vaccine. *JAMA*; 162: 1589-1596.
- 90** Savolainen-Kopra C, Samoilovich E, Kahelin H, Hiekka A, Hovi T, Merja Roivainen M 2009. Comparison of poliovirus recombinants: accumulation of point mutations provides further advantages. *Journal of General Virology*; 90: 1859–1868.
- 91** Schatzmayr, H.G., Filippis, A.M.B., Friedrich e Leal, M.L.F 2002.: Eradication of poliomyelitis in Brazil of Fundação Oswaldo Cruz. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*; 9: 11-24.

- 92** Smura TP, Junttila N, Blomqvist S, Norder H, Kaijalainen S, Paananen A, Magnius LO, Hovi T, Roivainen M 2007. Enterovirus 94, a proposed new serotype in human enterovirus species D. *Journal of General Virology*; 88: 849–858.
- 93** Solecki D, Gromeier M, Harber J, Bernhardt G, Wimmer E 1998. Poliovirus and its cellular receptor: a molecular genetic dissection of a virus/receptor affinity interaction. *Journal of Molecular Recognition*; 11: 2-9.
- 94** Stanway G, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypia T, King AMQ, Knowles NJ, Lemon SM, Minor PD, Pallansch MA, Palmenberg AC, Skern T 2005. Picornaviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Eds.), *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 757–778.
- 95** Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*; 24: 1596-1599.
- 96** Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- 97** Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM 1987. RNA viruses *In: Molecular Biology of the Gene*. 4.ed. New York: Cummings Publishing Company; 2: 910-915.
- 98** Westrop GD, Wareham KA, Evans DM, Dunn G, Minor PD, et al. 1989. Genetic basis of attenuation of the Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. *Journal of Virology*; 63: 1338-44
- 99** WHA (WORLD HEALTH ASSEMBLY) 1988. Global eradication of poliomyelitis by the year 2000. Geneva: World Health organization. Resolution WHA 41.28
- 100** White DO, Fenner FJ 1994. Picornaviridae. In: *Medical Virology* (ed. David O. White & Frank J. Fenner) 4<sup>th</sup> ed. Academic Press: 382-406.
- 101** WHO (World Health Organization) 1997. Polio eradication field guide. WHO/EPI/GEN/95.01 Rev.1 This document revises and replaces original version produced in 1995. Printed: July 1997

- 102** WHO (World Health Organization) 2003a. WHO–recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases WHO/V&B/03.01
- 103** WHO (World Health Organization) 2003b. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. WHO/V&B/03.03
- 104** WHO (World Health Organization) 2004a. Polio laboratory manual. 4th edition. WHO Geneva.
- 105** WHO (World Health Organization) 2004b. WHO global action plan for laboratory containment of wild polioviruses. Second edition. WHO/V&B/ 03.11.
- 106** WHO (World Health Organization) 2006a. Immunization Summary 2006. Statistical Reference. Disponivel em [http://www.unicef.org/publications/files/Immunization\\_Summary\\_2006.pdf](http://www.unicef.org/publications/files/Immunization_Summary_2006.pdf)
- 107** WHO (World Health Organization) 2006b. Inactivated poliovirus vaccine following oral poliovirus vaccine cessation. Weekly Epidemiological Record; 81: 137-144.
- 108** WHO (World Health Organization) 2009. Advisor Committee on the poliomyelitis eradication: recommendations on the uses of bivalent oral poliovirus vaccine types 1 and 3. Weekly Epidemiological Record; 84: 289-300.
- 109** WHO (World Health Organization) 2010a. Polio –Global Eradication Programme- Strategic Plan 2010-2012. WHO/polio/10.1 Geneva.
- 110** WHO (World Health Organization) 2010b. Vaccine-preventable diseases: monitoring system-global summary. WHO/IVB/2010. Geneva.
- 111** WHO (World Health Organization) 2010c. Polio vaccines and polioimmunization in the pre-eradication era: WHO position paper. Weekly Epidemiological Record; 85: 223-228.
- 112** WHO (World Health Organization) 2010d - 16<sup>th</sup> Informal Consultation on the Global Polio Laboratory Network, WHO/HQ, 23-24 September 2010 Geneva. Global Polio Laboratory Network: Update on accreditation status and performance concerns.
- 113** WHO (World Health Organization) 2011. Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization, November 2010. Summary, conclusions and recommendations. Weekly Epidemiological Record 86: 1-16.
- 114** WHO homepage (WORLD HEALTH ORGANIZATION) <http://www.who.int/vaccines/news/polionews/history.doc> em 24-01-2011
- 115** Wimmer E, Hellen C, Cao X 1993. Genetics of poliovirus. Annual Review of Genetics; 27: 353-436.