

ALINE PEÇANHA MUZY DIAS

AVALIAÇÃO DE UM PROTOCOLO VISANDO O DIAGNÓSTICO RÁPIDO DOS  
ENTEROVÍRUS ASSOCIADOS A CASOS DE PARALISIA FLÁCIDA AGUDA

PPGVS/INCQS

FIOCRUZ

2008

**AVALIAÇÃO DE UM PROTOCOLO VISANDO O DIAGNÓSTICO RÁPIDO DOS  
ENTEROVÍRUS ASSOCIADOS A CASOS DE PARALISIA FLÁCIDA AGUDA**

***Aline Peçanha Muzy Dias***

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz

Orientador: Dr. Edson Elias da Silva

Rio de Janeiro  
2008

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DE UM PROTOCOLO VISANDO O DIAGNÓSTICO RÁPIDO DOS  
ENTEROVÍRUS ASSOCIADOS A CASOS DE PARALISIA FLÁCIDA AGUDA**

*Aline Peçanha Muzy Dias*

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

---

Profa. Dra. Paola Cardareili Leite (INCQS/FIOCRUZ)

---

Profa. Dra. Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki (INCQS/FIOCRUZ)

---

Prof. Dr. José Nelson dos Santos Silva Couceiro (UFRJ)

Orientador:

---

Dr. Edson Elias da Silva

Rio de Janeiro

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Dias, Aline Peçanha Muzy

Avaliação de um protocolo visando o diagnóstico rápido dos enterovírus associados a casos de paralisia flácida aguda/ Aline Peçanha Muzy Dias. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2008.

xix, 73 p.:il. color

Dissertação (Mestrado)- Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2008.

Orientador: Edson Elias da Silva.

1. Enterovírus 2. Paralisia Flácida Aguda 3. RT-PCR 4. Diagnóstico  
5. Cultura celular. I. Título.

Evaluation of a protocol for the rapid diagnosis of enterovirus associated with acute flaccid paralysis cases.

Aos meus amados pais, irmão e  
madrinha, por todo o amor  
incondicional, dedicação, incentivo,  
abdicações, esforços, paciência,...

*“De tudo ficam três coisas:*

*A certeza de que estamos sempre começando...*

*A certeza de que precisamos continuar...*

*A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...*

*Portanto devemos:*

*Fazer da interrupção um caminho novo...*

*Da queda, um paço de dança...*

*Do medo, uma escada...*

*Do sonho, uma ponte...*

*Da procura, um encontro...”*

*(Fernando Pessoa)*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edson Elias da Silva pelo acolhimento, paciência, compreensão, estímulo, apoio, ensinamentos que permitiram a realização deste sonho.

A Eliane Veiga da Costa por ter me ajudado a carregar um peso que talvez eu não fosse capaz de suportar sozinha. Obrigada por cada palavra, por cada ombro, por cada explicação.

A Prof. Dra. Maria Helena pelo acolhimento, apoio, confiança, compreensão e incentivo para o ingresso no curso pós graduação em Vigilância Sanitária.

A todos da Coordenação de Pós Graduação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde pela colaboração, apoio, compreensão e paciência.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde por todos os ensinamentos passados.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde pela oportunidade de colocar em prática os conhecimentos adquiridos ao longo de todos estes anos de estudo, permitindo a realização de um sonho, a pesquisa aplicada, visando à saúde da população.

A Fundação Oswaldo Cruz pela oportunidade.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Ao “meninos” da sala de lavagem, Robson e Luiz, pelos bons momentos vividos e pelo apoio prestado.

Aos amigos de turma, Ludmila, Clarice, Carlos, Priscila, Viviane, Flávia, Marcus, Rafaela Gabriele e Thadeu, entre outros, pelo apoio, amizade, diversão, compreensão, paciência e pelos excelentes momentos vividos.

Aos amigos que passaram pelo Laboratório de Enterovírus e marcaram o meu coração: Rafaela, Josiane, Renata, Juliana, Paula, Ana Paula, Cátia, Rafael, Fernanda. Vocês fazem muita falta!

Aos amigos do Laboratório de Enterovírus, Fernanda, Fernando, Gina, Michele, Silas, Alex, Aline, Rafael, Júnior, Dolcy, Márcia e Viviane. Saibam que sem vocês eu não teria conseguido! Obrigada por cada ajuda, por cada palavra, por cada reação de PCR tirada do termociclador tarde da noite ou no dia seguinte, por cada análise de seqüência, por cada dado retirado no banco de dados, por cada gel de eletroforese, por me estimularem, por cada ombro amigo, por cada discussão amiga, por me fazerem acreditar que eu ia conseguir mesmo quando tudo parecia dar errado!

A minha amada madrinha Angela, por ter me acolhido em sua casa como uma filha e ter estado do meu lado sempre pronta para me ajudar.

Aos meus amados pais e irmão. Vocês são a minha força! Obrigada por tudo!

E sempre a Deus por ter colocado pessoas tão especiais na minha vida e por ter me dado forças para continuar.



## RESUMO

Os enterovírus estão entre os mais comuns vírus humanos e são de grande interesse devido à ampla variedade de infecções que podem causar. A vigilância das Paralisias Flácidas Agudas (PFAs) e o diagnóstico laboratorial dos enterovírus são partes críticas da iniciativa da Organização Mundial de Saúde para erradicação mundial da poliomielite, assim como a necessidade de disponibilizar técnicas rápidas para o diagnóstico diferencial destes vírus. A caracterização dos enterovírus é importante para a investigação da diversidade de vírus co-circulantes, para determinar a correlação entre dados celulares e bioquímicos durante a infecção, para relacionar o tipo de sintoma clínico com o sorotipo enteroviral, incluindo a investigação de vias de transmissão de enterovírus durante épocas de surtos. Além disso, a caracterização dos enterovírus é de extrema relevância para distinguir as infecções provocadas pelos *Poliovirus* dos enterovírus não-pólio no contexto do Programa de Erradicação da Poliomielite da OMS. O presente estudo teve como objetivo principal identificar, através da técnica de RT-PCR e seqüenciamento nucleotídico, a presença de enterovírus diretamente das amostras de primeira passagem de cultura celular a fim de diminuir o custo e o tempo de liberação do diagnóstico. Para isso, foram analisadas 221 amostras de casos suspeitos de PFA, inoculadas em primeira passagem de cultura de células RD. Destas, 17 foram positivas para enterovírus. A comparação da técnica com a indicada pela OMS mostrou alta sensibilidade e especificidade, indicando que a nova metodologia pode ser seguramente empregada como forma de garantia de um diagnóstico mais rápido.

## ABSTRACT

The enterovirus are among the most common human viruses, and are of great interest because of the wide variety of infections that can cause. The surveillance of Acute Flaccid Paralysis (AFP) and laboratory diagnosis of enterovirus are critical parts of the initiative of the World Health Organization (WHO) to eradicate polio worldwide, as well as the availability of rapid completion of techniques are needed for the differential diagnosis of these viruses. The characterization of enterovirus is important for the research of the diversity of virus co-circulating, to determine the correlation between cellular and biochemical data during infection, relate to the type of clinical symptoms with the serotype enteroviral, including investigation of routes of transmission of enterovirus during times of outbreaks. Moreover, the characterization of enterovirus is of extreme importance to distinguish Poliovirus infections caused by the enterovirus non pólio in the context of the Program for the Eradication of Poliomyelitis of WHO. The aim of this study is to identify, through RT-PCR and nucleotide sequencing, the presence of enterovirus genome directly from first passage of cell culture in order to reduce the cost and time of release of diagnosis. For that, were analyzed 221 samples of suspected cases of FAP, inoculated in first passage of RD cell culture. Seventeen samples were positive for enterovirus. The comparison this technique with the indicated by the WHO showed high sensitivity and specificity, indicating that the new method can be safely employed as a way of ensuring a faster diagnosis.

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

μL - Microlitro

5' NTR – Região 5' Não Codificante

a.C. – antes de Cristo.

AL - Alagoas

BA - Bahia

CDC - *Center for Disease Control and Prevention*, Atlanta, USA

cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar

CE - Ceará

cm<sup>2</sup> - Centímetros quadrados

CVA - *Coxsackievirus A*

CVB - *Coxsackievirus B*

DF - Distrito Federal

DICT 50 - dose infectante para 50% das culturas de células

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Deoxinucleosídeo trifosfatado

ddNTP – Dideoxinucleosídeo trifosfatado

DTT- Di-Thio-Treitol

ECP – Efeito citopático

eIPV - Vacina inativada contra a poliomielite melhorada

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

ES - Espírito Santo

EV - *Echovirus*

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FUNASA - Fundação nacional de saúde

g- Gramas

g/mL - Grama por mililitro

GO - Goiás

HCl – Ácido clorídrico

HEV - *Enterovirus Humanos*

ICTVdB - *International Comittee of Taxonomy of Virus data Basis*

IEC - Instituto Evandro Chagas

IPV – Vacina inativada contra a poliomielite

L2 - tampão de lavagem para a extração de ácidos nucleicos

L20B - células L de camundongo geneticamente modificadas que expressam um receptor humano para *Poliovirus*.

L6 - tampão de lise de isotiocianato de guanidina para a extração de ácidos nucléicos

LACEN - Laboratório Central

LEV – Laboratório de Enterovírus

M - Concentração molar

MEM - Meio mínimo essencial

MG - Minas Gerais

mg/ mL- Miligrama por mililitro

mL- Mililitro

mM - Concentração milimolar

MT - Mato Grosso

N – Concentração normal

ng – Nanogramas

NPEV- Enterovirus não-pólio.

°C – Graus Celsius

OMS - Organização Mundial de Saúde.

OPAS- Organização Pan-Americana de Saúde

OPV – Vacina oral contra a poliomielite

PB - Paraíba

pb - Pares de bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PE - Pernambuco

PFA – Paralisia Flácida Aguda

pH – Potencial de Hidrogênio

pmoles- Picomoles

ppm – Parte por milhão

PR - Paraná

PV - *Poliovirus*

PVDV- *Poliovirus* derivado vacinal

RD - Células de rhabdomiosarcoma humano

RJ - Rio de Janeiro

RN - Rio Grande do Norte

RNA - Ácido ribonucléico

rpm - Rotações por minuto

RS - Rio Grande do Sul

RT-PCR – Transcrição Reserva em Reação da Cadeia da Polimerase

SC - Santa Catarina

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SE - Sergipe

SES - Secretaria Estadual de Saúde

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SNC – Sistema Nervoso Central

SP - São Paulo

TAE- Tampão Tris-Acetato

*Taq* DNA polimerase - Enzima DNA polimerase proveniente da bactéria *Thermus aquaticus*.

TRS - *Template Supression Reagent*

U - Unidades

U/ mL- Unidades por mililitros

V- Volts

VPg - *virion protein genome linked*

x g- Valor multiplicado pela aceleração da gravidade

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Representação de uma vítima de poliomielite, Egito, 18<sup>a</sup> dinastia, 1350 a.C. Fonte: WIKIPEDIA, 2008. Disponível em: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Polio#cite\\_note-Paul\\_1971-4](http://en.wikipedia.org/wiki/Polio#cite_note-Paul_1971-4)>.....3
- FIGURA 2. Situação global dos casos de poliomielite entre os anos de 1988 e 2002. Países em cinza: países com casos de poliomielite. Países em vermelhos: países onde não há registros de casos de poliomielite. Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004. Disponível em: <http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/WHO-Polio-Manual-9.pdf> .....4
- FIGURA 3. Representação esquemática do genoma dos enterovírus e processamento da poliproteína. VP0, VP1, VP2, VP3 e VP4: proteínas estruturais que formam o capsídeo viral; VPg: proteína covalentemente ligada ao genoma viral; P1, P2 e P3: precursores protéicos; 2A, 2B, 2C, 3A, 3C, 3D: proteínas não estruturais (proteínases e RNA polimerase)..... 10
- FIGURA 4. Modelo esquemático da disposição das quatro proteínas que formam o capsídeo dos enterovírus. VP1, VP2 e VP3 estão expostos na superfície externa dos vírus enquanto VP4 fica exposto na superfície interna. VP1, VP2, VP3 e VP4: proteínas estruturais do capsídeo viral. Fonte: GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2008a. Disponível em: <<http://www.polioeradication.org/>>..... 11
- FIGURA 5. Mapa representativo da situação mundial das Paralisias Flácidas Agudas causadas por enterovírus não poliovírus durante o período de 2006 a fevereiro de 2008. Fonte: GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2008b. Disponível em: <[http:// www.Polioeradication.org/content/general/MonthlyGlobal\\_update.pdf](http://www.Polioeradication.org/content/general/MonthlyGlobal_update.pdf)>.....20
- FIGURA 6. Mapa representativo dos países pólio-endêmicos e dos países identificados como casos importados de poliomielite e a distribuição dos sorotipos de *Poliovirus*. Fonte: GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2008c. Disponível em: <<http://www.polioeradication.org/content/general/casemap.shtml>>.....23
- FIGURA 7. Fluxograma de envio de amostras de fezes e resultados para pesquisa de enterovírus. FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz; LACEN: Laboratório Central;

SES: Secretaria Estadual de Saúde; IEC: Instituto Evandro Chagas. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007. ....34

FIGURA 8. Perfil eletroforético, em gel de agarose a 1%, dos produtos da reação de PCR utilizando os *primers* específicos para enterovírus. Raia 1: Padrão de peso molecular de 50 pares de bases (*Invitrogen*), raia 2: amostra 37464, raia 3: amostra 37465, raia 4: amostra 37468 (positiva), raia 5: amostra 37469, raia 6: amostra 37470, raia 7: amostra 37471 (positiva), raia 8: controle negativo, raia 9: vazia, raia 10: amostra 37454 (positiva). ....52

**LISTA DE GRÁFICOS**

- GRÁFICO 1. Número de notificações de casos de Paralisia Flácida Aguda, de casos confirmados de poliomielite e de casos confirmados de poliomielite causada por *Poliovirus* selvagem em todo o mundo entre 1998 e 2007. Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008. ....22
- GRÁFICO 2. Número de casos confirmados de poliomielite e de notificações de casos de Paralisia Flácida Aguda, Brasil 1979 a 2005. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008. ....25
- GRÁFICO 3. Taxa de notificação de casos de paralisia flácida aguda (PFA), por 100.000 habitantes menores de 15 anos, Brasil, 2002 – 2006. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007. ....26
- GRÁFICO 4. Distribuição das amostras analisadas com suspeita de Paralisia Flácida Aguda (PFA) em função do local de coleta. ....50
- GRÁFICO 5. Distribuição das amostras analisadas com suspeita de Paralisia Flácida Aguda (PFA) em função do sexo do paciente. ....51
- GRÁFICO 6. Distribuição, em função do local de coleta, das amostras positivas para RT-PCR para detecção de enterovírus em amostras de primeira passagem em cultura de células da linhagem RD. ....53



**LISTA DE QUADROS**

|   |    |
|---|----|
| QUADRO 1. Distribuição dos sorotipos de <i>Enterovirus Humanos</i> de acordo com as espécies. Fonte: INTERNATIONAL COMMITTEE OF TAXONOMY OF VIRUSES, 2006. .... | 7  |
| QUADRO 2. Manifestações clínicas mais comuns causadas por enterovírus não-pólio. Fonte: SAWYER, 2002. ....  | 17 |
| QUADRO 3. Descrição das seqüências dos <i>primers</i> utilizados e sua posição de ligação no genoma viral. ....   | 44 |

**LISTA DE TABELAS**

- TABELA 1. Tabela utilizada para cálculo de sensibilidade e especificidade através da comparação dos resultados obtidos por duas técnicas de diagnósticos distintas. ....49
- TABELA 2. Resultado do seqüenciamento nucleotídico, identidade nucleotídica das amostras seqüenciadas, sexo e local da coleta de todas as amostras positivas para RT-PCR para detecção de enterovírus em primeira passagem da cultura de células da linhagem RD.....54
- TABELA 3. Comparação dos resultados obtidos pelo método padrão ouro (isolamento viral em duas passagens de célula RD e técnicas moleculares) realizado pelo Laboratório de Enterovírus com o resultado do seqüenciamento nucleotídico das amostras positivas para RT-PCR para a detecção de enterovírus em primeira passagem de cultura de células da linhagem RD. ....55
- TABELA 4. Comparação entre os resultados da RT- PCR em amostras de primeira passagem em cultura celular da linhagem RD com os resultados obtidos pelo isolamento viral utilizando a metodologia considerada padrão ouro realizada pelo Laboratório de Enterovírus.....56
- TABELA 5. Comparação entre os resultados da RT- PCR em amostras de primeira passagem em cultura celular da linhagem RD com os resultados obtidos pelo isolamento viral em cultura de células da linhagem RD realizado pelo Laboratório de Enterovírus (padrão ouro). ....57

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 1  |
| 1.1. Histórico dos enterovírus.....  | 2  |
| 1.2. Classificação dos enterovírus.....                                      | 6  |
| 1.3. Propriedades físico- químicas dos enterovírus.....                      | 9  |
| 1.4. Propriedade da partícula viral.....                                     | 10 |
| 1.4.1. Replicação do RNA .....   | 12 |
| 1.4.2. Características antigênicas .....                                     | 13 |
| 1.5. Patogenia .....   | 14 |
| 1.6. Patologia .....   | 16 |
| 1.7. Paralisia Flácida Aguda.....  | 17 |
| 1.7.1. Paralisia Flácida Aguda causada por enterovírus não-pólio .....       | 19 |
| 1.7.2. Frequência de casos das Paralisias Flácidas Agudas .....              | 21 |
| 1.7.3. Características clínicas das Paralisias Flácidas Agudas .....         | 26 |
| 1.8. Diagnóstico laboratorial dos enterovírus .....                          | 29 |
| 1.9. Rede nacional de diagnóstico de enterovírus.....                        | 33 |
| 1.10. Ações da Vigilância Sanitária .....                                    | 34 |
| 2. OBJETIVOS .....   | 39 |
| 2.1. Objetivo geral .....  | 39 |
| 2.2. Objetivos específicos .....   | 39 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....   | 40 |
| 3.1. Amostras clínicas .....   | 40 |
| 3.2. Tratamento das amostras clínicas para obtenção da suspensão fecal ..... | 40 |
| 3.3. Linhagens celulares .....   | 40 |
| 3.4. Isolamento viral .....  | 41 |
| 3.5. Extração do RNA viral .....   | 42 |
| 3.6. Síntese do c-DNA (RT-PCR).....  | 43 |
| 3.7. Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....                              | 44 |
| 3.8. Visualização do produto amplificado em gel de agarose .....             | 44 |
| 3.9. Purificação do ácido desoxirribonucléico - DNA.....                     | 45 |
| 3.10. Quantificação da massa de DNA.....                                     | 46 |
| 3.11. Reações cíclicas de seqüenciamento ( <i>Cycle Sequencing</i> ).....    | 46 |
| 3.12. Purificação dos produtos de <i>Cycle Sequencing</i> .....              | 47 |
| 3.13. Determinação da Identidade Viral.....                                  | 47 |

|   |    |
|---|----|
| 3.14. Comparação entre os resultados obtidos por RT-PCR e os resultados do método padrão ouro utilizado no Laboratório de Enterovírus ..... | 48 |
| 3.15. Cálculo da taxa de isolamento .....   | 48 |
| 3.16. Cálculo de especificidade e sensibilidade das análises .....  | 48 |
| 4. RESULTADOS .....   | 50 |
| 4.1. Perfil das amostras analisadas .....   | 50 |
| 4.2. Análise das amostras obtidas por RT-PCR .....  | 52 |
| 4.3. Resultado do seqüenciamento nucleotídico .....   | 53 |
| 4.4. Comparação entre os resultados obtidos por RT-PCR e os resultados do método padrão ouro utilizado no Laboratório de Enterovírus .....  | 54 |
| 4.5. Cálculo da Taxa de Isolamento .....  | 56 |
| 4.6. Cálculo da especificidade e da sensibilidade .....   | 56 |
| 5. DISCUSSÃO .....  | 58 |
| 6. CONCLUSÕES .....   | 65 |
| 7. REFERÊNCIAS .....  | 66 |

## 1. INTRODUÇÃO

A habilidade para controlar e erradicar doenças depende da habilidade de se detectar os agentes infecciosos que as causam. Algumas doenças produzem sintomas característicos e distintos que tornam a vigilância mais fácil. Entretanto, outras doenças podem se espalhar silenciosamente, possuírem grandes períodos de latência, entre exposição e sintomas, ou mesmo estes últimos ocorrendo em apenas uma fração dos indivíduos infectados (GOURVILLE et al., 2006)

Em 29 de setembro de 1994, o Brasil recebeu da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) o certificado de interrupção da transmissão dos vírus selvagens da poliomielite, confirmando a conclusão da comissão nacional que havia anteriormente declarado o país livre desses vírus. Esse feito foi a conclusão de uma longa luta contra a doença, que se estendeu por várias décadas, mobilizou mais de uma geração de profissionais da área da saúde em o todo país e, por fim, a própria sociedade brasileira, por meio das grandes campanhas nacionais de vacinação que ainda hoje ocorrem a cada ano (SCHATZMAYR et al., 2002).

Os enterovírus estão entre os mais comuns vírus humanos e são de grande interesse devido à ampla variedade de infecções que podem causar. Os enterovírus têm se tornado extremamente importantes durante a última década devido ao reaparecimento de cepas selvagens de *Poliovirus* e ocorrência de surtos de paralisia flácida aguda (PFA) em alguns países (Hispaniola em 2000-2001; Filipinas em 2001 e Madagascar em 2001-2002) causados pelos próprios vírus vacinais mutantes. A vigilância das PFAs e o diagnóstico laboratorial dos enterovírus são partes críticas da iniciativa da Organização Mundial de Saúde (OMS) para erradicação mundial da poliomielite, assim como a disponibilidade de realização de técnicas rápidas é necessária para o diagnóstico diferencial destes vírus (ITURRIZA-GÓMARA, MEGSON & GRAY, 2006; SHOJA et al., 2007a).

A caracterização dos enterovírus é importante para investigar a diversidade de vírus co-circulantes, para determinar a correlação entre dados celulares e bioquímicos durante a infecção, para relacionar o tipo de sintoma clínico com o sorotipo enteroviral, incluindo a investigação de vias de transmissão de enterovírus durante épocas de surtos. Além disso, a caracterização dos enterovírus é de extrema relevância para distinguir as infecções provocadas pelos *Poliovirus* dos Enterovírus Não-Pólio (NPEV) no contexto do Programa de Erradicação da Poliomielite da OMS (ITURRIZA-GÓMARA, MEGSON & GRAY, 2006).

## 1.1. Histórico dos enterovírus

Muitas das doenças que são agora definidas como causadas pelos enterovírus eram já conhecidas e foram descritas muito tempo antes da identificação destes agentes virais. Em alguns casos, “novas” doenças levaram ao isolamento de “novos” sorotipos de enterovírus. Pleurodinia, miocardite e herpangina foram descritas na segunda metade do século XIX e no início do século XX, muito antes dos *Coxsackievirus* serem descobertos. O aparecimento, em 1954, do “exantema de Boston” levou à identificação de um novo enterovírus, o *Coxsackievirus* A16. Durante uma pandemia de conjuntivite hemorrágica aguda que se espalhou a partir da África e Sudoeste da Ásia, de 1969 a 1973, um novo agente viral, o *Enterovirus* 71, foi identificado. Epidemias subseqüentes mostraram que uma variante antigênica de *Coxsackievirus* A24 foi também identificada como agente etiológico de conjuntivite hemorrágica aguda, doença altamente contagiosa (PALLANSCH & ROOS, 2001; DA SILVA, AZEVEDO & COSTA, 2005).

A história dos enterovírus é muito próxima à história dos *Poliovirus*. De fato, o estudo dos *Poliovirus* é um marco não apenas para os estudos sobre o gênero *Enterovirus*, mas para toda a virologia (PALLANSCH & ROOS, 2001).

Acredita-se que a poliomielite seja uma doença da antiguidade. Talvez o relato mais antigo seja uma figura egípcia de 1350 a.C. retratando um jovem com uma típica paralisia flácida assimétrica e atrofia da perna (FIGURA 1). Vários relatos dispersos também foram descritos entre os séculos XVII e XVIII. Por volta do século XIX, a revolução industrial trouxe o aumento da urbanização para a Europa e a América do Norte, e com isso, mudanças significativas e melhorias na condição de vida da população. Coincidindo com essas mudanças houve o advento dos maiores e mais freqüentes surtos de poliomielite. Desde o final do século XIX, surtos de poliomielite ocorreram em muitos países da Europa e nos Estados Unidos, e permaneceram como um problema de saúde pública até meados do século XX (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

A primeira descrição clínica da poliomielite foi feita no século XIX através de relatos de casos de paralisias com febre. Neste mesmo século, foram publicados trabalhos descrevendo a enfermidade e as mudanças patológicas nos neurônios motores da medula espinhal provocados pela poliomielite (PALLANSCH & ROOS, 2001).



FIGURA 1. Representação de uma vítima de poliomielite, Egito, 18<sup>a</sup> dinastia, 1350 a.C. Fonte: WIKIPEDIA, 2008. Disponível em: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Polio#cite\\_note-Paul\\_1971-4](http://en.wikipedia.org/wiki/Polio#cite_note-Paul_1971-4)>.

No século XX iniciou-se uma nova era na pesquisa sobre poliomielite e o início da compreensão sobre a natureza desta doença. Descreveu-se a natureza do *Poliovirus*, a importância dos indivíduos com infecção assintomática na transmissão deste vírus e o papel da infecção intestinal na patogênese da doença (PALLANSCH & ROOS, 2001).

O maior marco no estudo da poliomielite foi o sucesso da transferência experimental do vírus em primatas não humanos. A disponibilidade de modelos animais garantiu a oportunidade para estudar a doença fora dos pacientes humanos e produziu informações importantes sobre o processo de infecção e fisiopatologia da doença. Estudos posteriores do agente infeccioso levaram, em 1949, à propagação viral em cultura celular. Este avanço, juntamente à identificação dos três sorotipos do *Poliovirus*, abriu caminho para o subsequente desenvolvimento de vacinas e estudo das propriedades bioquímicas e biofísicas dos *Poliovirus* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

Na década de 50, foram propostas duas diferentes abordagens para a prevenção da poliomielite através da vacinação. Salk e Younger produziram, com sucesso, a primeira vacina contra o *Poliovirus* através da inativação química do vírus propagado em cultura celular utilizando formaldeído. Esta vacina era completamente

não infectante e, após a injeção, estimulava uma resposta imune que protegia o indivíduo vacinado contra a doença paralítica. Durante o mesmo período, alguns laboratórios procuravam produzir uma vacina atenuada contra o *Poliovirus*. A vacina oral contra o *Poliovirus* (OPV), desenvolvida por Sabin, foi licenciada em 1961. A partir desta data, extensos ensaios em campo foram realizados na União Soviética, Leste Europeu, e América Latina. As campanhas de imunização em massa em muitos países começaram em 1962 a 1963. Tanto a vacina inativada (IPV) quanto a OPV contém três componentes, um para cada sorotipo imunologicamente distinto de *Poliovirus*. Alguns países usam a IPV melhorada (eIPV) que contém mais unidades do antígeno tipo 2 e tipo 3 por dose que a IPV padrão. A ampla imunização com IPV, e desde 1963 com OPV, eliminou a poliomielite da maioria dos países (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004) (FIGURA 2).

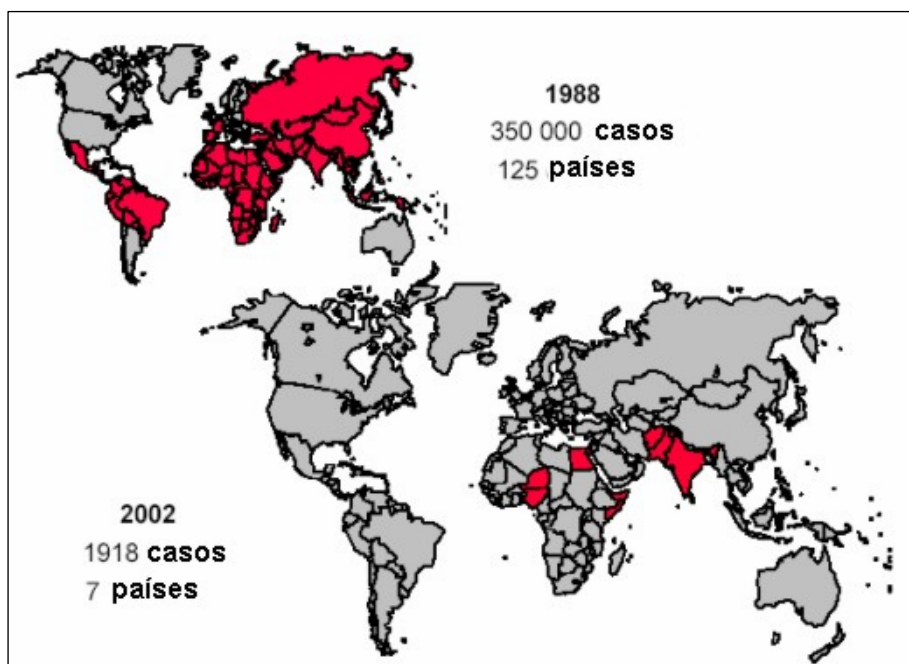


FIGURA 2. Situação global dos casos de poliomielite entre os anos de 1988 e 2002. Países em cinza: países com casos de poliomielite. Países em vermelhos: países onde não há registros de casos de poliomielite. Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004. Disponível em: <http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/WHO-Polio-Manual-9.pdf>

Apesar deste progresso, houve um número de lamentáveis equívocos sobre a poliomielite que inicialmente confundiram cientistas e desviaram esforços do controle da doença. Um destes equívocos foi a crença de que o *Poliovirus* era



exclusivamente neurotrópico, que a nasofaringe era o principal sítio de entrada do vírus no sistema nervoso central e que o vírus se espalhava pelo sistema nervoso através do nervo olfatório antes da viremia. Como resultado destes equívocos e do insucesso de várias tentativas mal concebidas de imunização, algumas com resultados bastante desastrosos, houve um clima de pessimismo, em meados do século XX, relativo ao eventual controle da poliomielite mesmo entre os cientistas que trabalhavam na área. A posterior descoberta de que a via preferencial de entrada do vírus era a fecal/oral e de que a infecção do sistema nervoso central era seguida pela viremia foram importantes para reforçar a esperança de uma imunização efetiva (PALLANSCH & ROOS, 2001).

Em 1948, foi investigado um surto de poliomielite na cidade de Coxsackie no estado de *New York*. Foram inoculadas suspensões fecais de pacientes com suspeita de poliomielite em cérebros de camundongos recém - nascidos. Isso levou a identificação dos *Coxsackievirus*, alguns dos quais desafiaram o cultivo *in vitro* (FENNER & WHITE, 1975). Os vírus isolados induziam doenças fatais com paralisia em camundongos recém nascidos, mas não em camundongos adultos, *hamsters* ou macacos *Rhesus*. No ano seguinte, *Coxsackievirus* do grupo B foram isolados a partir de casos de meningite asséptica (MELNICK, 1993; PALLANSCH & ROOS, 2001).

Como os *Coxsackievirus*, os *Echovirus* foram identificados através de um “acidente” durante a investigação para poliomielite. Pelo fato destes vírus terem sido originalmente isolados de fezes de indivíduos aparentemente normais, foram denominados *orphans* (órfãos), isto é, vírus sem uma doença parental. *Echovirus* é, portanto, uma sigla que deriva da expressão *Enteric Cytopathogenic Human Orphan Virus*. Estudos subseqüentes mostraram que os *Echovirus*, de fato, eram responsáveis por várias doenças humanas (FENNER & WHITE, 1975).

À medida que os estudos envolvendo os *Poliovirus*, *Coxsackievirus* e *Echovirus* continuaram, foi se tornando cada vez mais claro que estes vírus compartilhavam muitas outras características além do fato de terem como habitat o intestino humano. Foram então reconhecidos como pertencentes a um mesmo gênero, os *Enterovirus* (MELNICK, 1993).

A pesquisa sobre o *Poliovirus* possuiu um impacto significativo no campo da virologia molecular. O *Poliovirus* foi o primeiro vírus que se replica em célula animal completamente clonado e seqüenciado, o primeiro ácido ribonucléico (RNA) viral para o qual um clone infeccioso foi construído, e o primeiro vírus que teve a sua

estrutura tridimensional determinada por cristalografia (PALLANSCH & ROOS, 2001).

Os *Enterovirus*, originalmente estabelecidos em bases provisórias, foram posteriormente designados na forma de um gênero real, no qual os membros estavam de fato relacionados de modo fundamental. O agrupamento original foi validado por estudos utilizando as mais sofisticadas técnicas modernas de virologia molecular que permitem comparar a composição genética do vírus e os pormenores da sua estrutura e do seu modo de replicação (MELNICK, 1993).

## 1.2. Classificação dos enterovírus

O gênero *Enterovirus* é classificado dentro da família *Picornaviridae* (pico-pequeno; RNA- ácido ribonucléico) e consiste em agentes virais que podem infectar os humanos e outros vertebrados. A família *Picornaviridae* é ainda composta por outros 8 gêneros: *Rhinovirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus* e *Teschovirus* (DA SILVA, AZEVEDO & COSTA, 2005).

A maioria dos sorotipos de enterovírus humanos foi descoberta e descrita entre 1947 e 1963 como resultado da aplicação de cultura celular e inoculação em camundongos em fase de amamentação para a investigação de casos de poliomielite parálitica e outras doenças do sistema nervoso central (PALÁCIOS & OBERSTE, 2005).

Estudos sorológicos distinguiram 66 enterovírus humanos com base no teste de soro-neutralização, e variantes antigênicos adicionais foram definidos dentro dos sorotipos através de neutralização cruzada entre as cepas protótipos e cepas variantes (OBERSTE et al, 1999a). Os *Enterovirus Humanos* (HEV) foram originalmente classificados com base na doença humana (*Poliovirus* - PV), na replicação e patogênese em camundongos recém-nascidos (*Coxsackievirus A* – CVA afetam a musculatura estriada esquelética; *Coxsackievirus B* – CVB causam mudanças patológicas em muitos tecidos, incluindo sistema nervoso central, pâncreas, fígado e tecido adiposo marrom) e crescimento em cultura celular sem causar doença em camundongos (*Echovirus* - EV), mas eles foram recentemente reclassificados, baseados no relacionamento genético inferido através da análise do gene que codifica a principal proteína do capsídeo viral, VP1 (BOLANAKI et al, 2005; PALÁCIOS & OBERSTES, 2005).

Atualmente, segundo o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (*International Committee of Taxonomy of Virus data Basis - ICTVdB*), os *Enterovirus Humanos* são classificados em cinco espécies: *Poliovirus* e HEV A-D. A disposição dos sorotipos em cada espécie está descrita no QUADRO 1 (INTERNATIONAL COMMITTEE OF TAXONOMY OF VIRUSES, 2006)

Desde a sua descoberta, os enterovírus têm sido classificados de acordo com as propriedades antigênicas das proteínas do capsídeo. Como o número de sorotipos reconhecidos cresceu, a classificação antigênica tornou-se extremamente difícil, trabalhosa e demorada, devido ao grande número de ensaios de neutralização cruzada que devem ser realizados, assim como as relações antigênicas parciais entre diferentes sorotipos. Como resultado desta dificuldade, nenhum novo sorotipo viral foi descrito entre 1974 e 2001. A partir de 2001, a análise das seqüências nucleotídicas tem sido usada para definir 22 novos sorotipos de enterovírus humanos (HEV73- 91, 97 e 100-101). Muitos outros sorotipos adicionais (HEV92- 96 e HEV98-99) foram identificados, mas ainda não descritos (OBERSTE et al, 2007).

QUADRO 1. Distribuição dos sorotipos de *Enterovirus Humanos* de acordo com as espécies. Fonte: INTERNATIONAL COMMITTEE OF TAXONOMY OF VIRUSES, 2006.

| ESPÉCIE                            | SOROTIPO                         | ABREVIACÃO |
|------------------------------------|----------------------------------|------------|
| <i>Poliovirus</i>                  | <i>Poliovirus 1</i>              | PV 1       |
|                                    | <i>Poliovirus 2</i>              | PV 2       |
|                                    | <i>Poliovirus 3</i>              | PV 3       |
| <i>Human enterovirus A (HEV-A)</i> | <i>Human coxsackievirus A 2</i>  | (CV-A2)    |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 3</i>  | (CV-A3)    |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 5</i>  | (CV-A5)    |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 7</i>  | (CV-A7)    |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 8</i>  | (CV-A8)    |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 10</i> | (CV-A10)   |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 12</i> | (CV-A12)   |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 14</i> | (CV-A14)   |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 16</i> | (CV-A16)   |
|                                    | <i>Human enterovirus 71</i>      | (HEV71)    |
| <i>Human enterovirus B (HEV-B)</i> | <i>Human coxsackievirus B 1</i>  | (CV-B1)    |
|                                    | <i>Human coxsackievirus B 2</i>  | (CV-B2)    |
|                                    | <i>Human coxsackievirus B 3</i>  | (CV-B3)    |
|                                    | <i>Human coxsackievirus B 4</i>  | (CV-B4)    |
|                                    | <i>Human coxsackievirus B 5</i>  | (CV-B5)    |
|                                    | <i>Human coxsackievirus B 6</i>  | (CV-B6)    |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 9</i>  | (CV-A9)    |
|                                    | <i>Human echovirus 1</i>         | (EV-1)     |
|                                    | <i>Human echovirus 2</i>         | (EV-2)     |

| ESPÉCIE                            | SOROTIPO                         | ABREVIÇÃO |
|------------------------------------|----------------------------------|-----------|
| <i>Human enterovirus B (HEV-B)</i> | <i>Human echovirus 3</i>         | (EV-3)    |
|                                    | <i>Human echovirus 4</i>         | (EV-4)    |
|                                    | <i>Human echovirus 5</i>         | (EV-5)    |
|                                    | <i>Human echovirus 6</i>         | (EV-6)    |
|                                    | <i>Human echovirus 7</i>         | (EV-7)    |
|                                    | <i>Human echovirus 9</i>         | (EV-9)    |
|                                    | <i>Human echovirus 11</i>        | (EV-11)   |
|                                    | <i>Human echovirus 12</i>        | (EV-12)   |
|                                    | <i>Human echovirus 13</i>        | (EV-13)   |
|                                    | <i>Human echovirus 14</i>        | (EV-14)   |
|                                    | <i>Human echovirus 15</i>        | (EV-15)   |
|                                    | <i>Human echovirus 16</i>        | (EV-16)   |
|                                    | <i>Human echovirus 17</i>        | (EV-17)   |
|                                    | <i>Human echovirus 18</i>        | (EV-18)   |
|                                    | <i>Human echovirus 19</i>        | (EV-19)   |
|                                    | <i>Human echovirus 20</i>        | (EV-20)   |
|                                    | <i>Human echovirus 21</i>        | (EV-21)   |
|                                    | <i>Human echovirus 24</i>        | (EV-24)   |
|                                    | <i>Human echovirus 25</i>        | (EV-25)   |
|                                    | <i>Human echovirus 26</i>        | (EV-26)   |
|                                    | <i>Human echovirus 27</i>        | (EV-27)   |
|                                    | <i>Human echovirus 29</i>        | (EV-29)   |
|                                    | <i>Human echovirus 30</i>        | (EV-30)   |
| <i>Human echovirus 31</i>          | (EV-31)                          |           |
| <i>Human echovirus 32</i>          | (EV-32)                          |           |
| <i>Human echovirus 33</i>          | (EV-33)                          |           |
|                                    | <i>Human enterovirus 69</i>      | (HEV-69)  |
| <i>Human enterovirus C (HEV-C)</i> | <i>Human coxsackievirus A 1</i>  | (CV-A1)   |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 11</i> | (CV-A11)  |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 13</i> | (CV-A13)  |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 15</i> | (CV-A15)  |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 17</i> | (CV-A17)  |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 18</i> | (CV-A18)  |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 19</i> | (CV-A19)  |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 20</i> | (CV-A20)  |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 21</i> | (CV-A21)  |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 22</i> | (CV-A 22) |
|                                    | <i>Human coxsackievirus A 24</i> | (CV-A24)  |
| <i>Human enterovirus D (HEV-D)</i> | <i>Human enterovirus 68</i>      | (HEV-68)  |
|                                    | <i>Human enterovirus 70</i>      | (HEV-70)  |

Atualmente, os HEV 76, 89, 90, 91 e 92 estão classificados como membros da espécie HEV-A, os HEV73-75, HEV77-88, HEV97 e HEV100-101 como membros da espécie HEV-B, os HEV 95, 96 e 99 como membros da espécie HEV-C e o HEV94 como membros da espécie HEV-D (OBERSTE et al, 2007).

*Echovirus 22* e *23* foram reclassificados para o gênero da família *Picornaviridae* denominado *Parechovirus*, pois foram considerados geneticamente diferentes dos demais *Enterovirus* (OBERSTE et al, 1999a; SHOJA et al, 2007b).

### 1.3. Propriedades físico- químicas dos enterovírus

O vírion maduro é uma partícula extraordinariamente estável. Os enterovírus possuem uma densidade de 1,34 g/mL. Esses vírus, bem como os antígenos a eles associados, são resistentes a todos os antibióticos e agentes quimioterápicos conhecidos. São relativamente sensíveis ao calor (exceto se estabilizados com cloreto de magnésio), resistentes a detergentes fortes como SDS (dodecil sulfato de sódio), a pH ácido (pH 3 a 5, entre 1 e 3 horas), a enzimas proteolíticas e também a desinfetantes comuns utilizados em laboratório como álcool a 70%, éter, deoxicolato e outros solventes lipídicos. A capacidade do vírus se estabilizar em cloreto de magnésio levou ao largo uso deste composto como estabilizante da vacina oral de *Poliovirus*. Desta forma, pode-se concluir que os enterovírus são capazes de sobreviver ao tratamento da água de esgoto e à cloração como esta é geralmente praticada, sendo conseqüentemente abundantes nos esgotos urbanos e nos resíduos produzidos durante o tratamento de água (DA SILVA, AZEVEDO & COSTA, 2005).

Conforme descrito por Da Silva, Azevedo & Costa (2005), os enterovírus são inativados por vários agentes químicos e físicos.

Agentes físicos: Luz ultravioleta, secagem, calor extremo (50°C por 1 hora, exceto de estabilizado por cloreto de magnésio) e luz (em presença de corantes vitais como vermelho neutro, acridine laranja e proflavina).

Agentes químicos: na presença de matéria orgânica os vírus podem se associar entre si e se derivar protegendo-se contra a inativação. Os enterovírus são inativados por formaldeído a 0,3%, HCl a 0,1 N e cloro residual livre (0,3 ppm a 0,5 ppm), bem como outros halogênios como brometo residual livre ou iodo (aproximadamente 0,5 ppm) em 10 minutos de contato, quando na ausência de matéria orgânica.

Os enterovírus podem ser estocados a -70°C durante um prolongado período de tempo, apresentando pequena ou nenhuma perda da sua infecciosidade. Em meio líquido, conseguem sobreviver bem por semanas, quando estocados a 4°C, e por alguns dias em temperatura ambiente (DA SILVA, AZEVEDO & COSTA, 2005).

#### 1.4. Propriedade da partícula viral

Assim como os demais membros da família *Picornaviridae*, os enterovírus possuem uma estrutura genômica composta por um RNA de fita única e polaridade positiva, com um peso molecular de  $2,6 \times 10^6$  daltons (aproximadamente 7500 nucleotídeos), que é o próprio RNA mensageiro, poliadenilado na terminação 3' e que carrega uma pequena proteína (VPg- *virion protein genome linked*) covalentemente ligada a sua extremidade 5' não codificante (5'NTR) (FIGURA 3). São vírus pequenos, medindo aproximadamente 30 nm de diâmetro, esféricos e não envelopados (RACANIELLO, 2001; DA SILVA, AZEVEDO & COSTA, 2005).

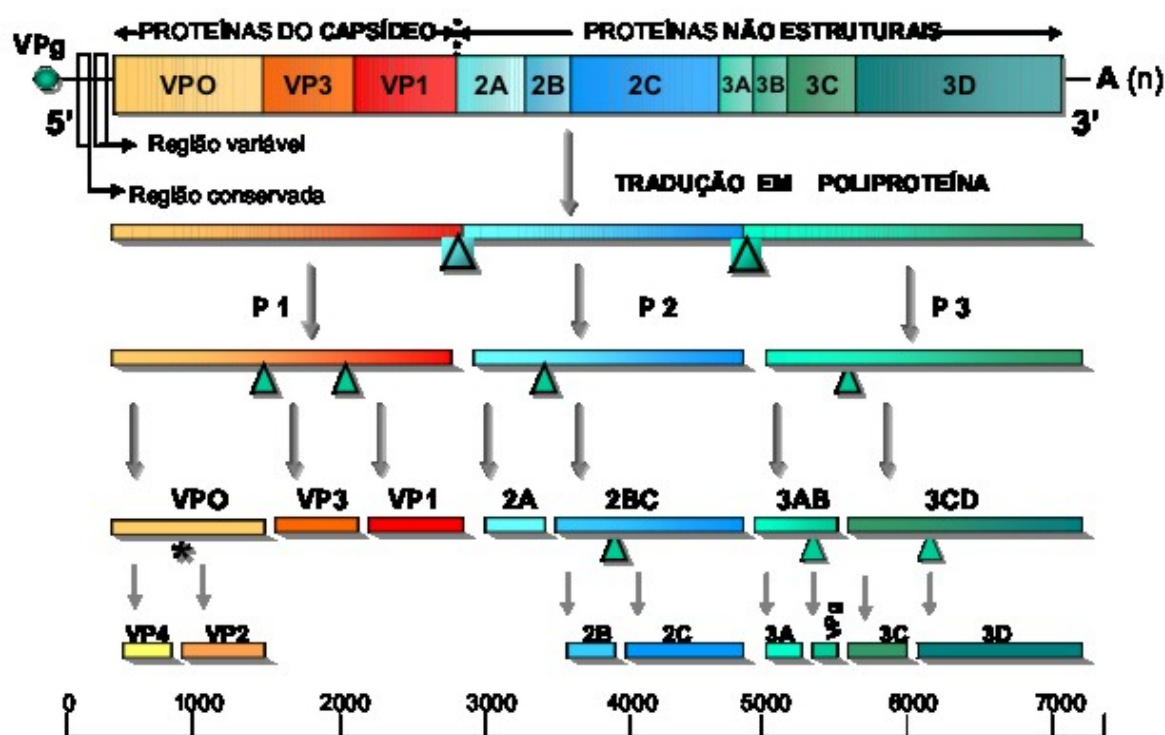


FIGURA 3. Representação esquemática do genoma dos enterovírus e processamento da poliproteína. VP0, VP1, VP2, VP3 e VP4: proteínas estruturais que formam o capsídeo viral; VPg: proteína covalentemente ligada ao genoma viral; P1, P2 e P3: precursores protéicos; 2A, 2B, 2C, 3A, 3C, 3D: proteínas não estruturais (proteínases e RNA polimerase).

O RNA contém uma única fase de leitura, codificando uma longa cadeia de polipeptídios, a poliproteína, com peso molecular de aproximadamente 240 Kd, que é clivada durante a tradução do genoma viral. Assim sendo, a proteína de

comprimento total não chega a ser formada (RACANIELLO, 2001; DA SILVA, AZEVEDO & COSTA, 2005)

O genoma viral é bem acondicionado dentro de um capsídeo de simetria icosaédrica, constituído por 60 cópias de cada uma das quatro proteínas denominadas VP1, VP2, VP3 e VP4. Estas proteínas são produtos de proteólise da poliproteína precursora. Em consequência de reações proteolíticas, o segmento P1, precursor das proteínas do capsídeo, é clivado em três polipeptídios: VP0, VP3 e VP1, que permanecem associados entre si sob a forma de "protômeros", mas que rapidamente se agregam para formar pentâmeros. Essas clivagens são realizadas por proteinases codificadas pelo vírus e que geram diversos produtos protéicos com diferentes funções como proteínas do capsídeo, proteinases e RNA polimerases. (RACANIELLO, 2001; DA SILVA, AZEVEDO & COSTA, 2005)

Os pentâmeros, a seguir, agregam-se para formar o procapsídeo. O empacotamento do RNA viral produz um rearranjo protéico no capsídeo que culmina com a clivagem de VP0 em VP4 e VP2. Os polipeptídios VP1, VP2 e VP3 estão expostos na superfície do vírion, enquanto VP4 fica internalizado no cerne do RNA (FIGURA 4) (RACANIELLO, 2001; DA SILVA, AZEVEDO & COSTA, 2005).

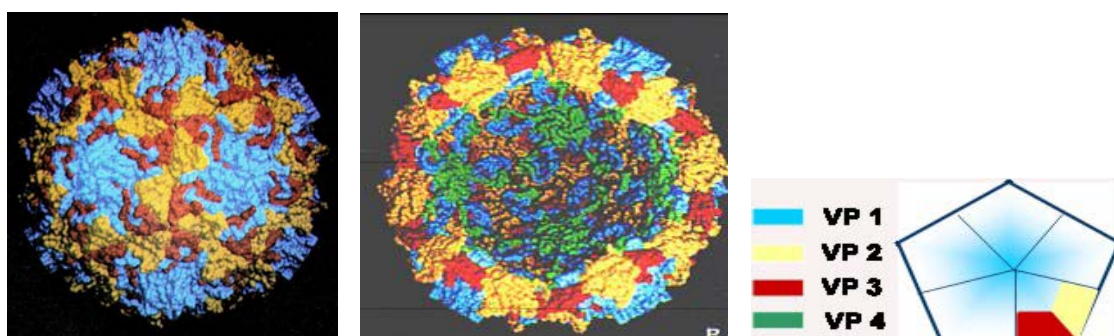


FIGURA 4. Modelo esquemático da disposição das quatro proteínas que formam o capsídeo dos enterovírus. VP1, VP2 e VP3 estão expostos na superfície externa dos vírus enquanto VP4 fica exposto na superfície interna. VP1, VP2, VP3 e VP4: proteínas estruturais do capsídeo viral. Fonte: GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2008a. Disponível em: <<http://www.polioeradication.org/>>.

A análise da estrutura tridimensional do vírion revelou que cada uma das três proteínas do capsídeo VP1, VP2 e VP3 formam uma barreira beta antiparalela de oito fitas. Esse padrão de dobra é largamente conservado nas proteínas do capsídeo de vírus RNA eucarióticos icosaédricos. As 60 cópias da pequena proteína do

capsídeo, VP4, por sua vez, delimitam a superfície interna do capsídeo (RACANIELLO, 2001; DA SILVA, AZEVEDO & COSTA, 2005).

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 recobrem a superfície externa do vírion. Na resposta imune ao vírus, anticorpos capazes de neutralizar a infecciosidade viral são normalmente produzidos contra essas seqüências, que são, portanto, os componentes mais importantes dos sítios antigênicos de neutralização. Os *Poliovirus*, por exemplo, possuem quatro sítios antigênicos de neutralização. É interessante que existam apenas três únicos conjuntos desses quatro sítios, e, deste modo, apenas três sorotipos de *Poliovirus* (sorotipos 1, 2 e 3) são observados na natureza. Desta forma, anticorpos produzidos contra o sorotipo 1 não são capazes de neutralizar significativamente a infecciosidade dos sorotipos 2 e 3. Não se tem conhecimento, até o momento, de *Poliovirus* ocorrendo naturalmente que possuam populações mistas destes sítios, assim como não têm sido observadas mudanças antigênicas que levam ao aparecimento de novos sorotipos virais. A estabilidade genética observada nos três sorotipos de *Poliovirus* é surpreendente se for levada em consideração a plasticidade dos genomas virais constituídos por RNA (DA SILVA, AZEVEDO & COSTA, 2005).

A falta de um envelope lipídico contribui para a estabilidade estrutural dos enterovírus, permitindo ao vírus ser estável quando exposto a pH gástrico e ao estresse ambiental. Os enterovírus permanecem viáveis por prolongados períodos no esgoto, água e mãos, aumentando assim a sua transmissibilidade. Quando congelados, estes vírus são estáveis por anos, até mesmo por décadas. Entretanto, deve-se tomar cuidado para não romper o capsídeo viral. O genoma dos enterovírus é protegido das ribonucleases ambientais enquanto o capsídeo se mantiver íntegro. Congelamento e descongelamento das amostras danificam o capsídeo, por isso a estocagem das amostras clínicas não deve ser feita em *freezers* de descongelamento rápido (ROMERO, 1999)

#### **1.4.1. Replicação do RNA**

A primeira etapa consiste na adsorção do vírus na membrana da célula hospedeira, seguida de penetração e perda do capsídeo, já no interior da célula hospedeira. A proteína VPg é removida do RNA viral pelas enzimas celulares. O



RNA, agindo como RNAm, é traduzido sem interrupção em uma única poliproteína, que é clivada autocataliticamente nos intermediários P1, P2 e P3. O intermediário P1 é clivado para produzir inicialmente VP0, VP1 e VP3 e, finalmente, as quatro proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP4. A região P2 codifica três proteínas não estruturais, incluindo uma com atividade de protease, enquanto a região P3 codifica quatro proteínas, incluindo a RNA polimerase, que é RNA-dependente e necessária para a replicação do RNA viral (RACANIELLO, 2001; DA SILVA, AZEVEDO & COSTA, 2005).

A síntese do RNA viral tem lugar em uma seqüência de eventos onde tomam parte as moléculas molde de RNA viral e a RNA polimerase codificada pelo vírus, além de outras proteínas virais e celulares. Todo este processo ocorre no interior do citoplasma associado à estrutura do retículo endoplasmático liso. A síntese da fita complementar (fita negativa) é iniciada na terminação 3' do RNA viral, e utiliza a proteína VPg como *primer*. Quando é completada, a fita complementar torna-se molde para a síntese do RNA viral (fita positiva). A maioria dos intermediários replicativos encontrados no processo de replicação consiste em moléculas de RNA completas (polaridade negativa), a partir das quais várias fitas nascentes de RNA com polaridade positiva são transcritas simultaneamente pela RNA polimerase viral (PALLANSCH & ROOS, 2001; DA SILVA, AZEVEDO & COSTA, 2005).

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 nos capsídeos. as partículas completas são liberadas pela desintegração da célula hospedeira (RACANIELLO, 2001).

A duração de um ciclo de replicação completo, desde a infecção até a completa montagem do vírus, varia de 5 a 10 horas, dependendo de alguns fatores como pH, temperatura, sorotipo do vírus, célula hospedeira, estado nutricional da célula hospedeira e o número de partículas virais que a infectam. Em condições ótimas, pode ocorrer a biossíntese de 25000 a 100000 partículas virais por célula, mas somente 0,1% a 10% destas são infecciosas (RACANIELLO, 2001).

#### **1.4.2. Características antigênicas**

Os epítomos responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes estão localizados em três das quatro proteínas estruturais. Estes sítios antigênicos são formados pelas VP1, VP2 e VP3 que constituem a superfície externa do capsídeo viral. A maior parte dos sítios antigênicos está agrupada em VP1, que é a proteína mais externa e a principal utilizada para estudos de epidemiologia molecular dos enterovírus (PALLANSCH & ROOS, 2001; DA SILVA, AZEVEDO & COSTA, 2005).

As infecções por enterovírus estimulam uma resposta sorotípica – específica direcionada aos epítomos da superfície do capsídeo viral. A imunidade de mucosa é a mais importante. Anticorpos sozinhos protegem plenamente contra a doença, provavelmente pela limitação da disseminação viral a partir do intestino, mas os anticorpos não protegem necessariamente contra a infecção (OBERSTE & PALLANSCH, 2003). Frequentemente a resposta humoral é heterotípica, isto é, a infecção de um sorotipo induz uma resposta imune cruzada para outro sorotipo. Crianças mais novas induzem uma resposta mais homotípica, enquanto crianças mais velhas e adultos desenvolvem uma resposta mais heterotípica. Essa diferença na especificidade da resposta humoral para infecções por enterovírus reflete a exposição a um grande número de sorotipos virais durante a fase de crescimento. A base desta resposta heterotípica não é conhecida, mas pode refletir a presença de epítomos compartilhados entre múltiplos sorotipos virais (PALACIOS & OBERSTE, 2005).

Dentro de um único sorotipo, pequenas diferenças antigênicas podem ocorrer entre diferentes isolados. A frequência de mutação para muitos enterovírus é da ordem 1 por 10000 vírions formados. A consequência é o aparecimento de uma amostra pouco neutralizada pelo soro imune produzido contra a cepa original (protótipo), mas que induz a produção de anticorpos (PALLANSCH & ROOS, 2001; DA SILVA, AZEVEDO & COSTA, 2005).

### **1.5. Patogenia**

A disseminação dos enterovírus ocorre, predominantemente, de pessoa para pessoa através da via fecal-oral, embora exposições a fontes de água como as de piscinas possam também levar à infecção (SAWYER, 2002).

A porta de entrada para a maioria dos enterovírus é, presumivelmente, o trato respiratório superior, geralmente através de ingestão de água, hortaliças ou alimentos contaminados. Alguns enterovírus, no entanto, possuem outras rotas de

infecção, as quais podem estar associadas ao tipo de doença (DA SILVA, AZEVEDO & COSTA, 2005).

O período de incubação das infecções causadas pelos enterovírus pode variar, podendo ser de uma a duas semanas nas infecções sistêmicas, ou bastante curto, como 12 a 24 horas, no caso de infecção da conjuntiva (DA SILVA, AZEVEDO & COSTA, 2005).

A mucosa intestinal e o trato respiratório superior são os sítios da infecção primária, com a disseminação secundária para o sistema nervoso central (SNC) e outros tecidos (OBERSTE & PALLANSCH, 2003).

A infecção por enterovírus se inicia quando o vírus é ingerido e se multiplica nas mucosas da orofaringe e do intestino. A partir destes sítios primários, os vírus se replicam nos linfonodos cervicais e mesentéricos, causando uma viremia transiente. A maioria das infecções naturais nos humanos termina nesta etapa com sintomas não específicos como dor de garganta, febre e mal estar. Acredita-se que a replicação viral em sítios extra-neurais mantém a viremia além da primeira etapa e aumenta a probabilidade da entrada do vírus no SNC. Alguns dos sítios extra-neurais de replicação podem ser o tecido adiposo marrom, o tecido retículo - endotelial e os músculos. Em 1 a 2% dos indivíduos infectados, o vírus atinge o SNC e se replica nos neurônios motores dentro da medula espinhal, tronco cerebral ou córtex motor. A replicação viral nos neurônios motores da medula espinhal leva às características de paralisia muscular. A replicação e a viremia ocorrem durante o período de incubação, ou seja, antes do desenvolvimento da doença, que é usualmente cerca de 4 a 7 dias (OBERST & PALLANSCH, 2003; RACANIELLO, 2006).

Duas rotas para a entrada do vírus no SNC têm sido sugeridas, as quais não são mutuamente exclusivas: o vírus atinge o SNC a partir do sangue ou entra em um nervo periférico e é carregado ao SNC através do transporte axonal. Está bem estabelecido que a viremia precedente da infecção parálitica é necessária para a entrada do vírus no SNC. Entretanto, a presença de anticorpos antivirais no sangue previne a invasão do cérebro e da medula espinhal (RACANIELLO, 2006).

Alguns sorotipos virais são mais suscetíveis a causar doença do que os outros. Coletivamente, estes vírus podem infectar todos os tecidos do corpo. Membros individuais de um grupo, entretanto, possuem tropismo para certos tecidos (por exemplo, *Coxsackievirus B* frequentemente infecta o coração, *Enterovirus 71*, o sistema nervoso central), mas alguns tropismos não são exclusivos nem específicos. Infecções com apenas um sorotipo viral podem apresentar diferentes manifestações

clínicas, assim como muitos sorotipos diferentes podem causar a mesma síndrome clínica (SAWYER, 2002).

Os enterovírus são citopáticos e muitas doenças presumivelmente associadas a eles resultam de destruição de células específicas dos tecidos atingidos, mas em algumas manifestações clínicas, como, por exemplo, o exantema enteroviral e a miocardite, ocorrem como resultado da resposta imune do hospedeiro à infecção (PALACIOS & OBERSTE, 2005).

Os vírus são excretados nas fezes por volta de 30 dias após o início da infecção, e estão presentes na faringe por uma ou duas semanas após a infecção; isto ocorre tanto nos indivíduos com sintomas como nos indivíduos com infecção subclínica. O título máximo de vírus excretado é de aproximadamente  $10^4$  partículas virais infecciosas por grama de fezes (OBERST & PALLANSCH, 2003).

## **1.6. Patologia**

As infecções causadas pelos enterovírus ocorrem predominantemente no verão e no outono em países de clima temperado, embora na maioria das comunidades casos esporádicos ocorram durante todo o ano (MARK & SAWYER, 2002). Apesar das infecções por enterovírus ocorrerem em todas as faixas etárias, as crianças são as vítimas mais comuns. As taxas de infecções infantis são muito superiores que as de adultos. Assim, as crianças representam a esmagadora maioria dos casos de doenças causadas por enterovírus (ROMERO, 1999).

Os enterovírus são responsáveis por muitas síndromes clínicas e envolvem quase todos os órgãos. As manifestações vão de resfriado comum a potenciais doenças fatais como meningite, encefalite, miocardite e septicemia neonatal fulminante (ROMERO, 1999). Os mesmos vírus que causam as síndromes mais comuns também podem ser os que causam infecções mais severas que ameaçam a vida (SAWYER, 2002). Algumas das manifestações clínicas mais comuns estão listadas no QUADRO 2.

Infecções causadas por enterovírus se assemelham a doenças bacterianas e freqüentemente levam a um uso desnecessário de antibióticos e testes diagnósticos até que a probabilidade de infecção bacteriana seja descartada. Infecções mais severas como meningite viral e encefalite, septicemia neonatal, paralisia flácida aguda, miocardite e infecções por enterovírus em pacientes imunocomprometidos

freqüentemente levam a hospitalização, terapia empírica com antibióticos e múltiplos testes laboratoriais para diagnóstico (SAWYER, 2002).

QUADRO 2. Manifestações clínicas mais comuns causadas por enterovírus não-pólio. Fonte: SAWYER, 2002.

| <b>INFECÇÕES RÁPIDAS</b>         | <b>INFECÇÕES POTENCIALMENTE SEVERAS</b>        |
|----------------------------------|--|
| Febre com ou sem erupção cutânea | Meningite                                      |
| Doença de pé, mão e boca         | Encefalite                                     |
| Herpangina                       | Paralisia flácida aguda                        |
| Pleurodinia                      | Miocardite/pericardite                         |
| Faringite                        | Hepatite                                       |
| Conjuntivite                     | Infecção crônica em paciente imunocomprometido |
| Crupe (laringotraqueobronquite)  | Septicemia neonatal                            |

### **1.7. Paralisia Flácida Aguda**

Paralisia Flácida Aguda (PFA) é a manifestação clínica mais comum das infecções causadas por *Poliovirus*, ocorrendo em 0 a 1% dos casos de infecção por estes vírus. A vigilância dos casos de PFA tem sido utilizada em todo mundo para monitorar o controle e a erradicação da circulação dos *Poliovirus* selvagens. Em 1988, quando a assembleia da OMS publicou a resolução para a erradicação da poliomielite, havia cerca de 100 países endêmicos, entretanto até o final de 2004 existiam apenas 6 (KELLY et al, 2006).

Embora existam referências de casos esporádicos de quadro clínico semelhante ao da poliomielite no final do século XIX, essa doença começou a ser melhor observada no país no início do século XX, no Rio de Janeiro (1907-11) e em São Paulo (1918). Surto de considerável magnitude foram observados na década de 1930, em Porto Alegre (1935), Santos (1937), São Paulo e Rio de Janeiro (1939), refletindo possivelmente a crescente urbanização do país (SCHATZMAYR et al, 2002).

A partir de 1950 foram descritos surtos em diversas cidades do interior, e em 1953 ocorreu no Rio de Janeiro a maior epidemia já registrada, atingindo o

coeficiente de 21,5 casos por cem mil habitantes (SCHATZMAYR et al, 2002).

Dados nacionais sobre a incidência da doença, disponíveis a partir de 1968, quando foi implantado um sistema de notificação semanal de várias doenças transmissíveis, inclusive a poliomielite, indicavam até 1980 entre 1.100 e 3.600 casos anuais de poliomielite. O problema tornava-se ainda mais grave pela ocorrência freqüente de surtos em diversos pontos do território nacional, gerando uma forte demanda de serviços de saúde e a presença de seqüelas paralíticas graves provocadas pela doença, com alto impacto social (SCHATZMAYR et al, 2002).

Em 1971, na tentativa de interromper a transmissão da doença, o Ministério da Saúde elaborou o Plano Nacional de Controle da Poliomielite. O plano estabelecia a vacinação em massa da população infantil, com a aplicação de três doses de vacina oral trivalente, com intervalos de seis a oito semanas entre cada uma delas, na faixa etária de três meses a quatro anos de idade, faixa esta que havia sido identificada como a mais susceptível de apresentar a doença. A vacina deveria ser aplicada simultaneamente em todos os estados, nas áreas urbanas com mais de dois mil habitantes (SCHATZMAYR et al, 2002).

Em 1982, após melhorias no programa nacional de vacinação, apenas 122 casos de poliomielite foram registrados no país, o que representou a incidência de 0,1 caso por cem mil habitantes. Nos dois anos seguintes, a redução no número de casos foi ainda maior, o que demonstrava que os oito dias nacionais de vacinação até então executados, e que alcançaram coberturas próximas a 100%, haviam possibilitado, pela primeira vez, o real controle da infecção no país (SCHATZMAYR, et al, 2002).

Uma queda no percentual de cobertura vacinal foi observada durante os anos de 1984 até a segunda metade de 1986, em relação aos anos anteriores. O número de casos voltou imediatamente a elevar-se para 142, em 1984; no ano seguinte, a queda do percentual de cobertura vacinal acentuou-se, decaindo para apenas 80%, o que resultou no aumento do número de casos para 329 em 1985, e 612 em 1986. O fator mais importante para essas quedas de cobertura vacinal parece ter sido a crença de que a poliomielite já havia sido controlada em definitivo, além de problemas operacionais nas campanhas de vacinação nesses anos, quando se tentou a vacinação contra outras doenças no mesmo dia da vacinação oral, o que gerou sérias dificuldades no plano local (SCHATZMAYR et al, 2002).

No período de fevereiro a julho de 1986, um novo problema surgiu com a ocorrência de uma epidemia de poliomielite na região Nordeste, provocada pelo sorotipo 3 do *Poliovirus*. Um estudo sorológico realizado em crianças vacinadas da região demonstrou um baixo nível de anticorpos para esse sorotipo, o que certamente contribuiu para a dispersão do vírus tipo 3 na região e para a formação da epidemia. Somente após a epidemia no Nordeste, a quantidade de vírus do tipo 3 na vacina passou a ser de seiscentas mil partículas infectantes, o dobro da dosagem anterior (SCHATZMAYR et al, 2002).

A partir do segundo semestre de 1986, considerando-se os problemas específicos do Nordeste, foi instituída mais uma campanha anual de vacinação limitada àquela região, o que resultou na queda do número de casos, para 197, em 1987. Nos anos seguintes, ainda foram observados casos na região Nordeste, sobretudo em áreas urbanas com baixo nível de saneamento básico, até que foram notificados, finalmente, os três últimos casos de poliomielite causados por vírus selvagens, nos estados do Rio Grande do Norte e da Paraíba, no ano de 1989. O último caso de poliomielite causado por esse tipo de vírus no Brasil ocorreu no município de Sousa, na Paraíba, tendo o quadro de paralisia se iniciado em 19 de março daquele ano. Nas Américas, o último caso ocorreu no Peru, com início da paralisia em 22 de agosto de 1991. Com isso, obteve-se a erradicação dos vírus selvagens da poliomielite de todo continente americano (SCHATZMAYR et al, 2002).

### **1.7.1. Paralisia Flácida Aguda causada por enterovírus não-pólio**

Com o decréscimo acentuado dos casos de PFA, causado pela erradicação dos *Poliovirus*, um novo campo se abriu para o estudo de outros enterovírus englobados no termo “não – pólio”, que estão associados a surtos e epidemias em diversas localidades do mundo (FIGURA 5). Embora a maioria das infecções não deixe seqüela nos pacientes, há relato de casos que apresentaram conseqüências fatais. Vários sorotipos de *Coxsackievirus* e *Echovirus* foram diretamente relacionados a quadros de comprometimento motor, assim como casos e epidemias já foram anteriormente relacionados ao *Enterovirus 71* que parece ter um tropismo particular pelo SNC freqüentemente conduzindo a um quadro de PFA (LAMARÃO & GOMES, 2002).

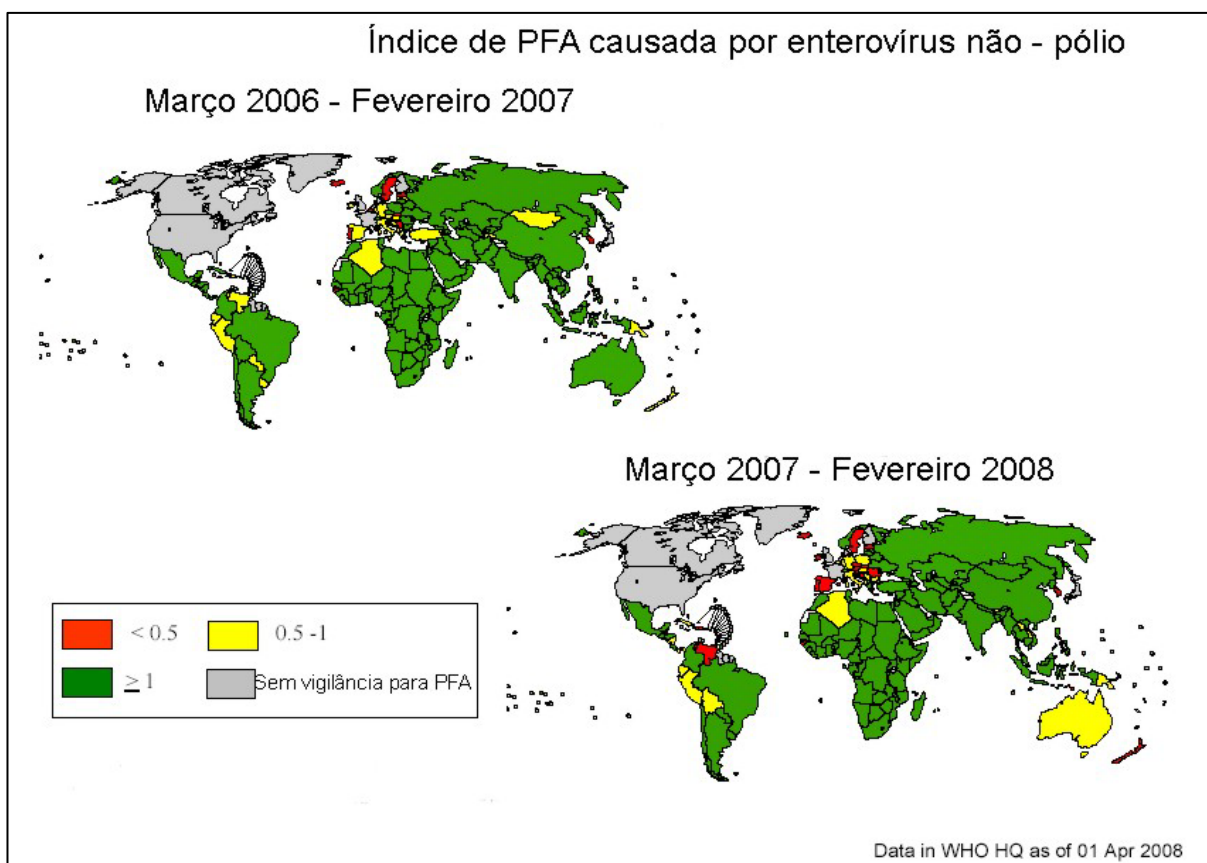


FIGURA 5. Mapa representativo da situação mundial das Paralisias Flácidas Agudas causadas por enterovírus não poliovírus durante o período de 2006 a fevereiro de 2008. Fonte: GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2008b. Disponível em: <[http:// www.Polioeradication.org/content/general/MonthlyGlobal\\_update.pdf](http://www.Polioeradication.org/content/general/MonthlyGlobal_update.pdf)>.

Em uma epidemia provocada por *Enterovírus 71* na Bulgária no ano de 1975, a doença paralítica ocorreu em cerca de 21% dos 700 pacientes, com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 30% (PALLANSCH & ROOS, 2001).

O *Enterovirus 70*, agente etiológico de epidemias de conjuntivite hemorrágica aguda, pode provocar sérios quadros de PFA. A incidência de paralisia é de, provavelmente, 1 em 10000 infecções. Esses pacientes podem também ter paralisia dos nervos cranianos, anormalidades do sistema nervoso autônomo e sinais sensoriais. Algumas vezes as infecções provocadas pelo *Enterovirus 70* podem causar paralisia dos nervos cranianos isolada, mas comumente envolvendo os nervos faciais (PALLANSCH & ROOS, 2001).

Dados da OMS revelam que entre os anos de 1967 e 1970, a PFA estava presente em menos de 1% de todos os pacientes com infecções causadas por *Coxsackievirus* e *Echovirus* (SOJI et al, 2007).



Estudos em alguns países têm revelado o aumento da frequência de enterovírus não - pólio (NPE) como agentes etiológicos de PFA. Na Índia, houve um aumento de 20% para 54% nos casos de PFA associados a NPE. A maioria dos casos de PFA nos Estados Unidos, na era pós-vacinação, foi causada por NPE. Muitos casos de paralisia foram reportados em associação com enterovírus, principalmente *Coxsackievirus* na Escócia. Cerca de 34% dos casos de PFA do Paquistão estão associados a NPE. A PFA também tem sido relatada em associação com *Coxsackievirus* B2-B6, *Enterovirus 71* e *Echovirus* sorotipos 3, 4, 6, 9, 11, 19 e 22 (SAEED et al, 2007; SHOJA et al, 2007b).

Em um estudo realizado na Austrália entre os anos de 1996 e 2004 foram pesquisadas 162 amostras de pacientes entre 0 e 15 anos com sintomatologia característica para PFA, das quais 26 apresentaram efeito citopático característico para a presença de enterovírus. Além de *Poliovirus*, foram isolados *Coxsackievirus* A24, *Coxsackievirus* B5, *Enterovirus 71*, *Enterovirus 75*, *Echovirus 9*, *Echovirus 11* e *Echovirus 18* (KELLY et al, 2006).

Soji et al (2007) mostraram que das 4171 amostras oriundas de 2097 casos de PFA na Nigéria, 307 (14,6%) eram positivas para NPE. Testes de soroneutralização mostraram que os sorotipos mais encontrados foram *Coxsackievirus* B, e *Echovirus* 3, 4, 7, 12, 13, 27, 29 e 33.

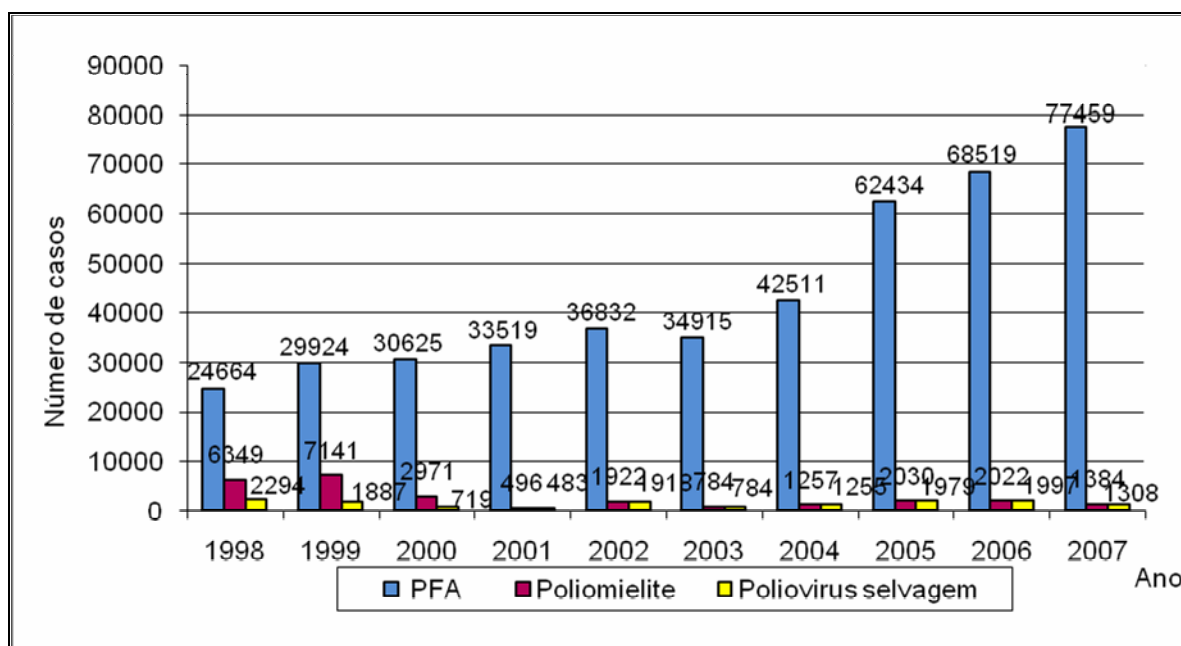
### **1.7.2. Frequência de casos das Paralisias Flácidas Agudas**

Em 2005, todos os países sob liderança da OMS mantiveram a sensibilidade geral da vigilância da PFA para detectar casos de poliomielite nos níveis do padrão de certificação. A notificação das PFAs continuou a melhorar nas três regiões com transmissão endêmica do *Poliovirus* (África, Mediterrâneo Oriental e Sudeste da Ásia). Um aumento de 43% na notificação da PFA foi observado, de 42.511 casos em 2004, para 62.434 casos em 2005 (GRÁFICO 1), principalmente devido à notificação aumentada da Índia (80% do aumento geral), Nigéria e Paquistão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

Embora o alvo da certificação para a notificação de PFA (ou seja, uma taxa de PFA não-pólio de pelo menos 1 caso por 100.000 crianças menores que 15 anos) permaneça inalterada, em 2005, o Comitê Consultivo em Erradicação da Poliomielite endossou um novo alvo de pelo menos 2 casos por 100.000 crianças para todos os países pólio-endêmicos e países sob alto risco para a importação do *Poliovirus*

selvagem. A intenção dessa recomendação foi acelerar a detecção e a resposta à circulação dos *Poliovirus* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

GRÁFICO 1. Número de notificações de casos de Paralisia Flácida Aguda, de casos confirmados de poliomielite e de casos confirmados de poliomielite causada por *Poliovirus* selvagem em todo o mundo entre 1998 e 2007. Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008.



Segundo dados da OMS, o atual panorama mundial apresenta um quadro com quatro países pólio-endêmicos (Afeganistão, Índia, Nigéria e Paquistão) e oito com casos identificados como casos importados de poliomielite (Angola, Chad, Congo, Sudão, Níger, Somália, Myanmar e Nepal), totalizando 1307 casos de poliomielite nos doze países no ano de 2007 (FIGURA 6) (GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2008c).

Devido à re-configuração da ordem econômica mundial recente e, principalmente, às contínuas mudanças decorrentes da globalização e da rapidez da circulação de pessoas e mercadorias e os seus possíveis efeitos sobre a saúde das populações, as práticas de vigilância sanitária se tornaram crescentemente relevantes, levando à necessidade de medidas de proteção da saúde ao mesmo tempo ágeis e firmes (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006).

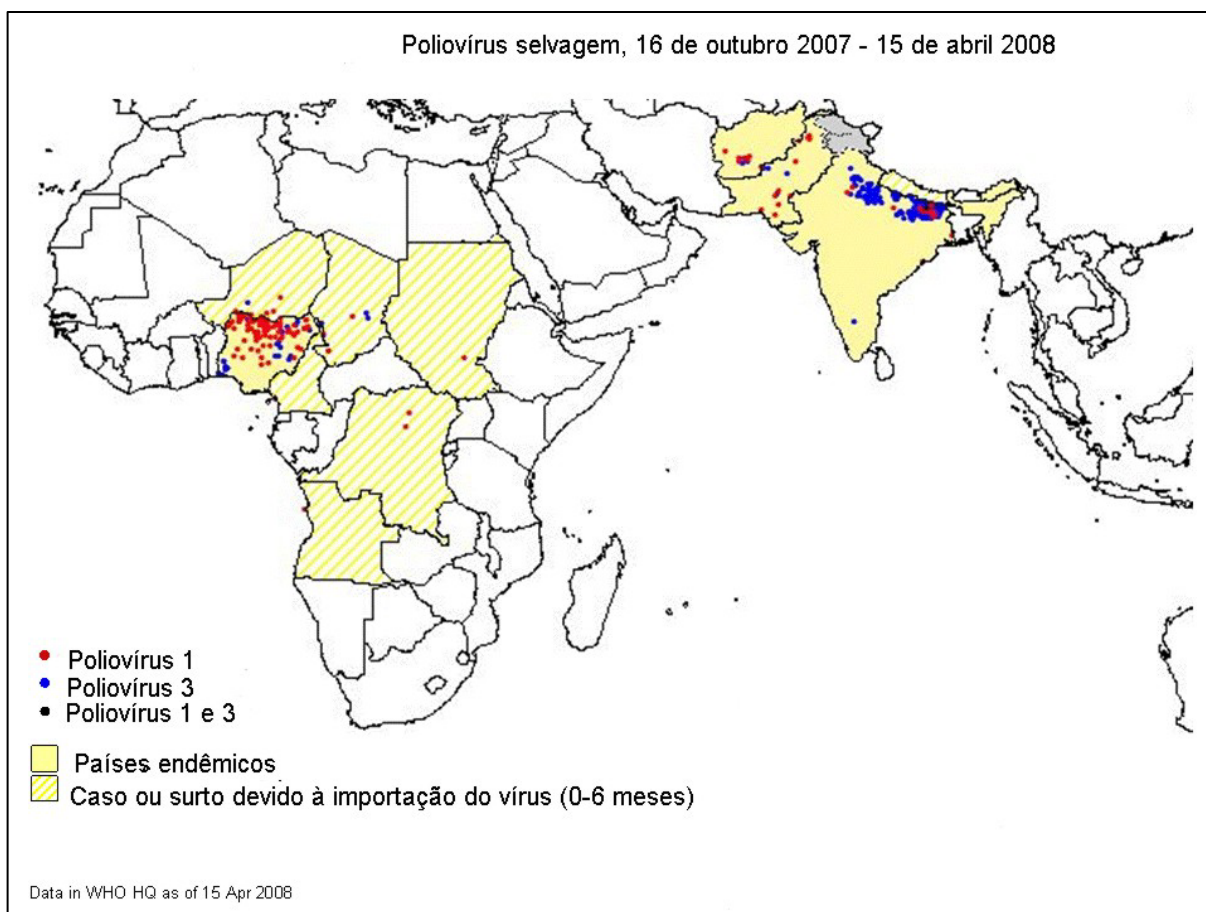


FIGURA 6. Mapa representativo dos países pólio-endêmicos e dos países identificados como casos importados de poliomielite e a distribuição dos sorotipos de *Poliovirus*. Fonte: GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2008c. Disponível em: <<http://www.polioeradication.org/content/general/casemap.shtml>>.

Uma das medidas relevantes desta necessidade diz respeito a uma ruptura do conceito tradicional de vigilância sanitária, processo no qual a esta é assumida como ação de proteção e promoção à saúde, percebendo-se também a importância do seu papel interventor na construção do acesso aos bens essenciais de interesse da saúde. Para que se caminhe em busca da maior eficácia da ação reguladora em vigilância sanitária é necessário, além do controle dos riscos advindos do desenvolvimento tecnológico, a inclusão dos riscos relacionados aos grandes problemas sanitários, dada a expressão do perfil epidemiológico brasileiro onde se superpõem problemas da modernidade aos antigos problemas de saúde, típicos do atraso econômico e cultural e da desigualdade de acesso (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006).

Portanto, cabe à vigilância sanitária, em articulação com as demais práticas de saúde, atuar no âmbito da proteção contra danos, riscos e determinantes dos problemas de saúde que afetam a população. Assim, a intersectorialidade é adotada,

permitindo o estabelecimento de espaços compartilhados para o desenvolvimento das ações e serviços de saúde (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006).

Nesse sentido, estabelece-se como ação essencial à revisão do processo de planejamento e execução das ações de vigilância sanitária sob uma nova visão, a da responsabilidade sanitária, por meio da definição de um elenco norteador de ações que permita assimilar as diversidades locais, os problemas de saúde e as necessidades de intervenção frente à estrutura existente. Neste sentido, o trabalho conjunto entre as vigilâncias sanitária e epidemiológica forma a vigilância em saúde que é capaz de gerar ações mais efetivas para a promoção e proteção da saúde da população (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006).

Desta forma, dentro do programa de erradicação da poliomielite, o principal objetivo da vigilância epidemiológica no Brasil é manter erradicada a poliomielite, e especificamente, monitorar a ocorrência de casos de PFA em menores de 15 anos de idade; acompanhar e avaliar o desempenho operacional do sistema de vigilância epidemiológica das PFAs no país. Para isso, todo caso de PFA a esclarecer em menores de quinze anos ou suspeita de poliomielite em indivíduo de qualquer idade, deve ser obrigatoriamente notificado, investigado imediatamente, registrado no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), coletada uma amostra de fezes até o 14º dia do início da deficiência motora para isolamento viral (amostra oportuna) e esclarecimento diagnóstico, e o caso deve ser encerrado no sistema em até 60 dias após a notificação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

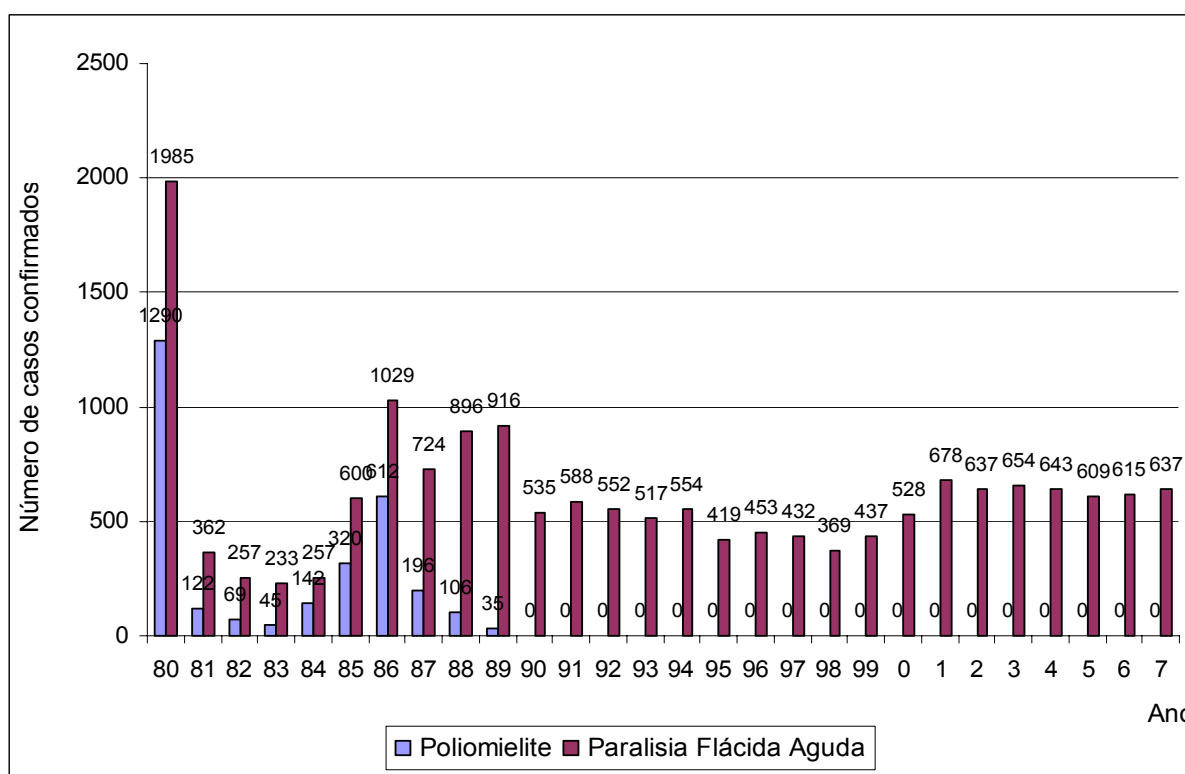
A qualidade da vigilância epidemiológica das PFAs é avaliada com base nos seguintes indicadores de desempenho operacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007): taxa de notificação; investigação epidemiológica em até 48 horas após a notificação dos casos; coleta de uma amostra oportuna de fezes e proporção de notificação semanal negativa/positiva.

Exceto a taxa de notificação que é de no mínimo 1 caso/100.000 menores que 15 anos, para os demais indicadores a meta mínima esperada é de 80% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Atualmente, ainda há riscos de re-introdução do *Poliovirus* selvagem no país decorrente da entrada de vírus através de pessoas infectadas provenientes de países endêmicos, dentre os quais a Nigéria, Índia, Paquistão e Afeganistão, ou pela ocorrência de surtos devido à circulação do *Poliovirus* derivado vacinal (PVDV) em áreas de baixas coberturas vacinais com a OPV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

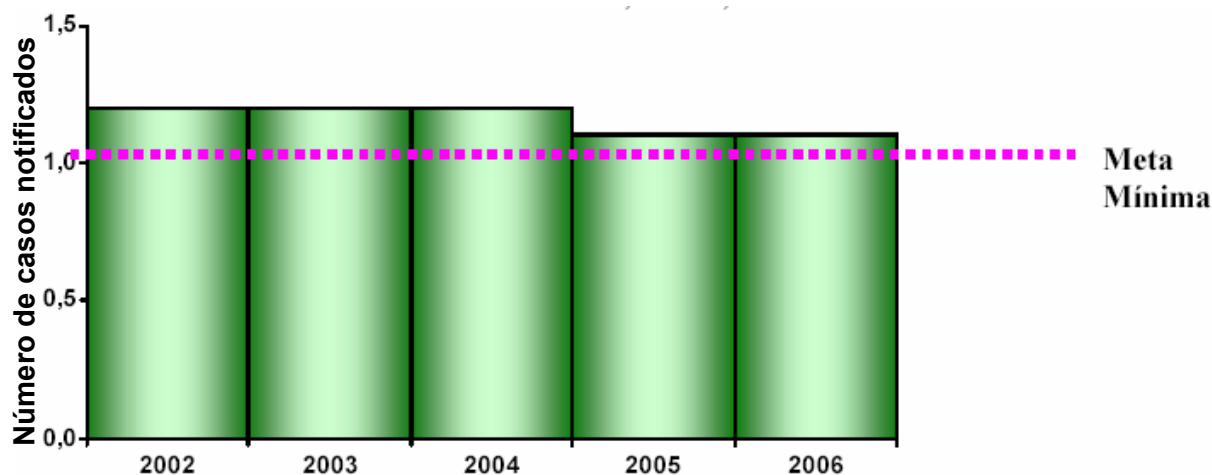
O GRÁFICO 2 demonstra a evolução dos casos de poliomielite e paralisia flácida aguda no Brasil, desde 1979 até 2005. Analisando o GRÁFICO 2, verifica-se que ocorreram 609 notificações de PFA no ano de 2005, sendo que não foi registrado nenhum caso de poliomielite desde 1990. O último caso de poliomielite foi registrado no município de Souza, na Paraíba em 1989 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

GRÁFICO 2. Número de casos confirmados de poliomielite e de notificações de casos de Paralisia Flácida Aguda, Brasil 1979 a 2005. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008.



O GRÁFICO 3 apresenta a taxa de notificação de casos de PFA por 100.000 habitantes menores de 15 anos de idade no Brasil, no período de 2002 a 2006. Os resultados sugerem que a vigilância tem sido sensível para a detecção de casos de PFA, uma vez que a meta estabelecida vem sendo alcançada. Todavia, chama atenção, o declínio desta taxa nos últimos anos (2005 e 2006), cujos resultados apresentam-se discretamente superiores à meta mínima esperada, que é de um caso de PFA por cada 100 mil habitantes menores de 15 anos. Ressalte-se ainda, que em alguns estados este indicador tem sido insatisfatório: Pará, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Alagoas, necessitando melhorar a sensibilidade da vigilância (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

GRÁFICO 3. Taxa de notificação de casos de paralisia flácida aguda (PFA), por 100.000 habitantes menores de 15 anos, Brasil, 2002 – 2006. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007.



### 1.7.3. Características clínicas das Paralisias Flácidas Agudas

Um caso de poliomielite é definido como: qualquer paciente, menor que 15 anos, com paralisia flácida aguda, para o qual nenhuma outra causa pode ser identificada. É importante lembrar que outros enterovírus, especialmente o *Enterovirus 71*, podem causar um quadro clínico semelhante ao da poliomielite e que os casos atípicos de pólio, dificilmente são diferenciados da síndrome de Guillain-Barré. A síndrome de Guillain-Barré (polirradiculite infecciosa aguda) é uma polineuropatia desmielinizante aguda e progressiva, que se manifesta por uma paralisia flácida ascendente; sua incidência varia de 0,2 a 0,6 por 100.000 crianças menores de 15 anos e é aumentado em menores de 5 anos. A etiologia dessa síndrome é desconhecida, mas sabe-se que em mais de 70% das vezes, a doença se inicia após infecções agudas. Embora a maioria dos casos não esteja associada à pólio, todo caso de Guillain-Barré, assim como todo caso de paralisia flácida aguda, deve ser notificado e investigado para afastar a possibilidade de ser poliomielite. A vigilância da incidência das PFAs faz parte das estratégias da OMS para o controle da poliomielite (BRICKS, 1997).

A partir de 1985, época em que foi lançado o Programa de Erradicação na região das Américas, os casos de poliomielite foram definidos como: (VERANE, MARANHÃO & LAENDER, 1993)

-Caso Suspeito: caso de paralisia aguda em qualquer pessoa menor de 15 anos, cuja origem não seja um traumatismo grave (esta classificação é provisória, devendo em 48 horas ser definido como caso provável ou caso descartado).

-Caso Provável: caso de paralisia flácida aguda de origem indeterminada.

-Caso Confirmado: caso provável com confirmação de ensaios laboratoriais, nexos epidemiológico com outro caso, paralisia residual decorridos 60 dias do início, falecimento do caso provável.

Com o desenvolvimento do programa de erradicação da poliomielite nas Américas, ocorrido entre 1985 a 1990, assistiu-se à diminuição drástica dos casos de pólio. A definição de caso tornou-se mais abrangente, mais sensível, passando à detecção de casos de paralisia flácida aguda como condição de entrada no Sistema de Vigilância, ao passo que aumentou a especificidade ao longo das etapas de investigação, chegando-se a confirmação do caso através do isolamento do *Poliovirus* selvagem (VERANE, MARANHÃO & LAENDER, 1993).

Em 1990, o Grupo Técnico Assessor para a erradicação da pólio elaborou as seguintes definições (VERANE, MARANHÃO & LAENDER, 1993):

-Poliomielite Confirmada: enfermidade paralítica flácida aguda associada ao isolamento de *Poliovirus* selvagem.

- Poliomielite Vacinal: enfermidade paralítica flácida aguda associada ao isolamento do vírus vacinal em pessoa que tenha recebido a OPV 30 dias antes da manifestação da doença e que não tenha sido exposta a OPV depois da manifestação dos sintomas.

- Poliomielite Compatível (ou Pólio Provável): enfermidade paralítica flácida aguda, com paralisia residual aos sessenta e cinco dias após o início dos primeiros sintomas, ou morte, ou falta de acompanhamento, para a qual não existam pelo menos duas amostras de fezes, obtidas num prazo de duas semanas após a manifestação dos sintomas e examinadas em três laboratórios.

Apenas 1 de cada 200 infecções causadas pelo *Poliovirus* numa população suscetível resulta na doença paralítica conhecida como poliomielite/ PFA. A paralisia é classificada como espinhal ou bulbar, dependendo se a medula espinhal ou o tronco cerebral, respectivamente, estão envolvidos. Com frequência, a forma espinhal se torna associada a forma bulbar durante o curso da doença, resultando na forma bulbo-espinhal. A poliomielite espinhal é geralmente assimétrica, flácida e limitada às extremidades a ao tronco, e varia de uma ligeira fraqueza a completa quadriplegia. Apenas cerca de 10 a 15% dos casos de poliomielite são de pólio

bulbar, um termo que indica o envolvimento dos nervos cranianos motores ou centros medulares que controlam a respiração e o sistema vaso-motor. Os nervos cranianos mais freqüentemente afetados são os pares IX e X, levando a paralisia dos músculos da faringe e laringe resultando numa dificuldade de deglutição e fala. O envolvimento de outros pares de nervos cranianos pode levar a fraqueza dos músculos da face (par VII) e da língua (par XII). A forma mais temida de poliomielite é a que envolve a formação reticular do tronco cerebral, resultando em um comprometimento respiratório, necessitando, muitas vezes, de suporte para ventilação pulmonar (PALLANSCH & ROOS, 2001).

A patologia da poliomielite é um tipo de inflamação e destruição da medula cinza do SNC, especialmente da coluna vertebral. A infecção generalizada da medula cinza no SNC demonstra que a doença é na realidade um tipo de polioencefalomielite (isto é, inflamação na medula cinza do cérebro e da coluna vertebral) e não apenas poliomielite (inflamação da medula cinza da coluna vertebral) (PALLANSCH & ROOS, 2001).

Embora o foco da patologia na coluna vertebral seja o corno anterior, também existem anormalidades no sistema motor do corno posterior e da área intermediolateral da coluna. Similarmente, o tronco cerebral mostra envolvimento com um número de núcleos de nervos craniais sensoriais e da formação reticular juntamente com os núcleos dos nervos cranianos motores. Os neurônios são destruídos com a evidência de cromatólise seguida de neurofagia (PALLANSCH & ROOS, 2001).

Quando combinadas características como idade menor de seis anos, instalação súbita da deficiência motora em menos de quatro dias acompanhada de febre, assimetria acometendo a musculatura dos membros e com mais freqüência os inferiores, flacidez muscular com diminuição ou abolição de reflexos na área paralisada e a sensibilidade conservada, a definição dos casos de poliomielite ocorre com uma especificidade de 80% (VERANE, MARANHÃO & LAENDER, 1993; PROENÇA et al, 2005).

Definir um caso de poliomielite tomando-se apenas a característica da paralisia flácida tem uma especificidade nula. Isto traz conseqüências importantes para a vigilância epidemiológica, já que a revisão de alguns casos sugere que a definição de categorias, como a de caso, pode estar associada a um maior período de pendência na investigação, retardando os mecanismos de bloqueio de um surto (VERANE, MARANHÃO & LAENDER, 1993).



A avaliação da qualidade da vigilância da poliomielite/paralisia flácida aguda dá-se através de alguns indicadores mais importantes: percentual de unidades com notificação negativa, percentual de casos investigados em 48 horas, percentual de casos com coleta adequada de fezes, taxa de notificação (PROENÇA et al, 2005).

O diagnóstico definitivo da poliomielite, portanto, requer confirmação laboratorial, geralmente através do isolamento do vírus nas fezes, que é, ainda, considerado o método mais confiável (BRICKS, 1997).

### **1.8. Diagnóstico laboratorial dos enterovírus**

O diagnóstico laboratorial de infecções por enterovírus é feito a partir do isolamento viral em, pelo menos, duas passagens em culturas celulares específicas, seguido pela identificação do sorotipo através de soroneutralização (BOLANAKI et al, 2005). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, duas linhagens celulares, L20B (células L de camundongo geneticamente modificadas que expressam um receptor humano para *Poliovirus*) e RD (células de rabdiosarcoma humano) são utilizadas para a detecção dos enterovírus no diagnóstico de PFA. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

O isolamento viral em cultura celular é demorado (3 a 10 dias), relativamente insensível (sensibilidade de 65-75%) e depende da presença de partículas virais viáveis. Além disso, nem todos os enterovírus podem ser cultivados em cultivos celulares, e para o isolamento e caracterização da maioria dos *Coxsackievirus A* (com exceção dos CV-A5, CV-A9, CV-A16 e CV-A24), a inoculação em camundongos recém-nascidos ainda é necessária. Outros fatores que também podem constituir-se em problemas para a execução da técnica são a contaminação microbiológica e toxicidade associadas à amostra clínica a ser utilizada para a inoculação nos cultivos celulares (ITURRIZA-GÓMARA, MEGSON & GRAY, 2006; SHOJA et al, 2007a).

O teste de soroneutralização, apesar de ser considerado “padrão ouro” para a sorotipagem de enterovírus, também é um teste trabalhoso e demorado e pode falhar na identificação viral devido à agregação de partículas virais, variações antigênicas, presença de mistura viral ou inespecificidade do anti-soro (os anti-soros padrões amplamente utilizados foram preparados contra cepas protótipos que foram isoladas há 40 - 50 anos atrás). Anti-soros para todos os sorotipos virais, geralmente, não estão disponíveis e os vírus isolados podem não ser de um sorotipo

de enterovírus humano conhecido, o que obviamente representa uma dificuldade na identificação por técnicas como soro-neutralização que requerem soros específicos para cada sorotipo viral (OBERSTE & PALLANSCH, 2003). Em alguns casos a agregação viral pode ser resolvida através de filtração, tratamento da suspensão viral com clorofórmio, utilização de agentes redutores além de detergente não iônico antes da neutralização, mas um pré-tratamento das amostras aumenta significativamente o tempo de execução de uma metodologia já trabalhosa. A presença de uma mistura viral pode ser solucionada através de purificação em placa ou limite de diluição, entretanto, mais uma vez, estas etapas aumentam do trabalho e o custo da detecção dos sorotipos de enterovírus (OBERSTE et al, 2000)

O desenvolvimento da tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sua subsequente adaptação para a detecção do RNA genômico dos enterovírus através da Transcrição Reversa em Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) constituem-se em um método sensível, específico e extremamente rápido para a detecção dos enterovírus. A RT-PCR requer apenas uma pequena amostra, geralmente 100 a 200  $\mu$ L de fluídos ou 1 mg de tecido. O processo é extremamente versátil e pode ser usado para detectar o genoma viral a partir de inúmeros fluídos corporais (líquido cefalorraquidiano, soro, urina, líquido pericárdico), tecidos (coração, fígado e músculos), além de fezes e *swabs* retais e nasofaríngeos (ROMERO, 1999).

Entre as razões para a eficácia de ensaios baseados em RT-PCR em detrimento do isolamento em cultura celular está o fato de que os ácidos nucléicos geralmente são mais estáveis que as partículas virais intactas. Assim, se a viabilidade do vírus for comprometida durante a manipulação da amostra, os resultados da cultura celular podem ser negativos, enquanto a PCR ainda detecta ácidos nucléicos residuais. Além disso, durante a replicação viral, são produzidas algumas partículas virais defectivas que são incapazes de infectar a célula, mas que possuem ácidos nucléicos, sendo, portanto detectados pela RT-PCR (SAWYER, 2002).

A análise da seqüência completa do genoma de todas as cepas protótipo mostraram que as espécies permanecem filogeneticamente coerentes em todo o genoma, exceto na 5'NTR (OBERSTE et al, 2006).

A 5'NTR desempenha um papel crítico no ciclo dos enterovírus pois contém elementos essenciais para a replicação do genoma viral e tradução das proteínas codificadas. Devido a natureza crucial dessas funções, não é surpresa que as

seqüências nucleotídicas que têm absoluta conservação entre os enterovírus têm sido identificadas dentro da 5'NTR utilizando hibridização de ácidos nucléicos e seqüenciamento nucleotídico (ROMERO, 1999). Essas regiões conservadas de alta homologia (5'NTR, e junção entre VP4 e VP2) têm sido exploradas para o desenvolvimento de *primers* e sondas utilizados na RT-PCR para a detecção de enterovírus (KILPATRICK et al, 1996; ROMERO, 1999; BOLANAKI et al, 2005).

Seqüências em várias porções do genoma dos enterovírus codificam regiões relacionadas com a espécie, mas apenas as seqüências que codificam as proteínas do capsídeo viral são capazes de determinar o sorotipo, devido a alta freqüência de recombinação inter-sorotípica entre enterovírus co-circulantes da mesma espécie (PALACIOS & OBERSTE, 2005).

Estudos filogenéticos sobre a junção entre VP4 e VP2 sugerem que esta região é mais adequada que a 5'NTR para o desenvolvimento de diagnóstico sorotipo específico, apesar desta região estar correlacionada apenas parcialmente com o sorotipo viral (OBERSTE et al, 1999b).

A proteína VP1 é a mais externa e imunodominante do capsídeo de todos os picornavírus. A maioria dos sítios de neutralização reside na VP1, mas epítomos responsáveis pela especificidade do sorotipo e das variações intratípicas não foram identificados. Se os mais importantes sítios de neutralização sorotípica se encontram na VP1, então a seqüência nucleotídica que codifica a VP1 possui alguma relação como sorotipo viral. Devido à complexidade da estrutura tridimensional do capsídeo dos enterovírus e ao fato da maioria dos sítios de neutralização ser descontínuo, não é possível correlacionar resíduos específicos da VP1 com sítios antigênicos responsáveis pela especificidade dos sorotipos. Comparação de seqüências e reconstruções filogenéticas sugeriu que a VP1 contém informações sorotípicas específicas que podem ser utilizadas para identificação viral e estudos de filogenia molecular (OBERSTE et al, 1999a).

Oberste et al. (1999a) determinaram a seqüência completa de nucleotídeos que codifica a proteína VP1 de 47 enterovírus humanos e 10 variantes antigênicos para testar se a seqüência da VP1 poderia ser aplicada para a classificação de vírus não-pólio e para determinar a relação filogenética entre os enterovírus humanos. Estes dados se tornaram úteis para estudos de epidemiologia molecular em surtos ou epidemias de enterovírus através de um melhor entendimento das correlações genéticas dos sorotipos e para o desenvolvimento de reagentes moleculares para o diagnóstico enteroviral.

Assim, em 1999, Oberste et al. descreveram um método para identificação de enterovírus isolados, baseado na amplificação por RT-PCR do gene que codifica a proteína VP1 do capsídeo e comparou a seqüência amplificada com o banco de dados da seqüência VP1 de todos os sorotipos virais. O fato de o código genético ser degenerado e da grande diversidade genética, mesmo dentro de um sorotipo viral, fizeram com que fosse necessário o uso de um par de *primer* degenerado ou múltiplos pares de *primers* para amplificar todos os sorotipos de enterovírus. Foram desenhados *primers* que continham resíduos de deoxi-inosina nas posições onde o código variava. Assim estes *primers* amplificavam moldes de RNA de todos os enterovírus humanos, a maioria dos enterovírus não humanos e de alguns rinovírus não humanos (OBERSTE et al, 1999b; NIX, OBERSTE & PALLANSCH, 2006).

A seqüência nucleotídica dos enterovírus foi utilizada pela primeira vez como ferramenta epidemiológica para caracterizar geograficamente a distribuição dos *Poliovirus* selvagens utilizando uma pequena seqüência da proteína VP1. Esses resultados mostraram que os vírus encontrados numa dada região eram geneticamente muito próximos entre si e diferentes daqueles circulantes em outras regiões (KEW et al, 1993). Desde então, a seqüência genômica da região VP1 foi adotada como padrão molecular para investigações epidemiológicas tanto de *Poliovirus* quanto para os demais sorotipos de enterovírus (PALÁCIOS & OBERSTE, 2005).

As altas taxas de mutação e recombinação dos enterovírus, o fato das cepas que circulam nos dias atuais serem geneticamente diferentes daquelas isoladas a 30 ou 40 anos atrás, devido à diversidade genética natural dos enterovírus e a sobreposição das regiões analisadas de cepas heterotípicas representam algumas dificuldades para o diagnóstico molecular dos enterovírus (BOLANAKI et al, 2005). Apesar disto, a RT-PCR pode fornecer resultados rápidos, de 5 a 24 horas a partir do recebimento da amostra, e assim alterar significativamente os cuidados médicos oferecidos aos pacientes. Com muita sensibilidade e um intervalo de tempo menor do que a da cultura celular, a caracterização com a técnica da PCR possibilita a redução da hospitalização desnecessária e diagnóstico ou intervenção terapêutica (SAWYER, 2002).

Segundo a OMS, o padrão ouro para detecção e isolamento dos enterovírus adotado pelos laboratórios de referência em diagnóstico das PFAs é feito da seguinte forma: as amostras fecais oriundas de casos diagnosticados como PFA são tratadas e inoculadas em duas linhagens celulares (RD e L20B). Durante 5 dias são

feitas leituras a procura de efeito citopático (ECP) característico. Após 5 dias, todas as amostras de primeira passagem são inoculadas novamente nas respectivas culturas celulares. Novamente, são feitas leituras diárias, durante 5 dias, em microscópio em busca do ECP característico. As amostras positivas são então analisadas para identificar o sorotipo, através de soroneutralização, ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) hibridização por sonda, ou PCR. No caso da utilização da PCR, primeiramente, as amostras têm seu genoma amplificado para confirmação do gênero *Enterovirus*. As que forem positivas para *Enterovirus* são submetidas a outra sucessão de 3 RT-PCR para verificar se são *Poliovirus*, e a que sorotipo pertencem e, ainda, se são vacinais ou não. Todo o processo leva em torno de 21 dias e é a metodologia seguida por todos os laboratórios que fazem parte da rede de diagnóstico da OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

### **1.9. Rede nacional de diagnóstico de enterovírus**

Atualmente, três laboratórios compõem a rede brasileira de diagnóstico do *Poliovirus*. Dois laboratórios foram instituídos como referência regional: o Instituto Evandro Chagas (IEC/PA) e o Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) do estado de Pernambuco. O Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ / Ministério da Saúde, em seu Laboratório de Enterovírus no Rio de Janeiro, acumula a função de laboratório de referência regional e referência nacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

No Brasil, as técnicas laboratoriais utilizadas para o diagnóstico do *Poliovirus* são o isolamento viral, a soroneutralização, a PCR e o seqüenciamento nucleotídico. A identificação do agente viral isolado pode ser realizada através de testes de soroneutralização com o uso de soros imunes específicos ou através da técnica de PCR. A técnica de PCR amplifica seqüências nucleotídicas específicas presentes no genoma viral, permitindo reconhecer o vírus isolado como pertencente ao gênero dos *Enterovirus*. O seqüenciamento nucleotídico identifica o número de mutações e as possíveis recombinações que possam ter ocorrido no genoma do *Poliovirus* vacinal isolado, em relação à seqüência do vírus da poliomielite correspondente, além de determinar o sorotipo dos demais enterovírus. O vírus é considerado como sendo semelhante ao vírus vacinal se o número de mutações for de até 0,9%. A partir de 1%, o vírus é considerado como *Poliovirus* vacinal derivado. Os vírus derivados readquirem as características biológicas dos *Poliovirus* selvagens, tais

como neurovirulência e capacidade de circulação por tempo prolongado na comunidade. Para a vigilância epidemiológica, estes vírus devem ser considerados como selvagens (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A amostra de fezes constitui o material mais adequado para o isolamento dos enterovírus. Embora os pacientes PFA eliminem os vírus durante semanas, os melhores resultados de isolamento são alcançados com amostras fecais coletadas na fase aguda da doença (até 14 dias). Todo caso conhecido tardiamente deverá ter uma amostra de fezes coletada até 60 dias após o início da deficiência motora (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

No ano de 2005, foram estabelecidos os atuais fluxos de envio de amostras e de resultados para a Rede de Diagnóstico de Poliomielite/ PFA, conforme o fluxograma da FIGURA 7.

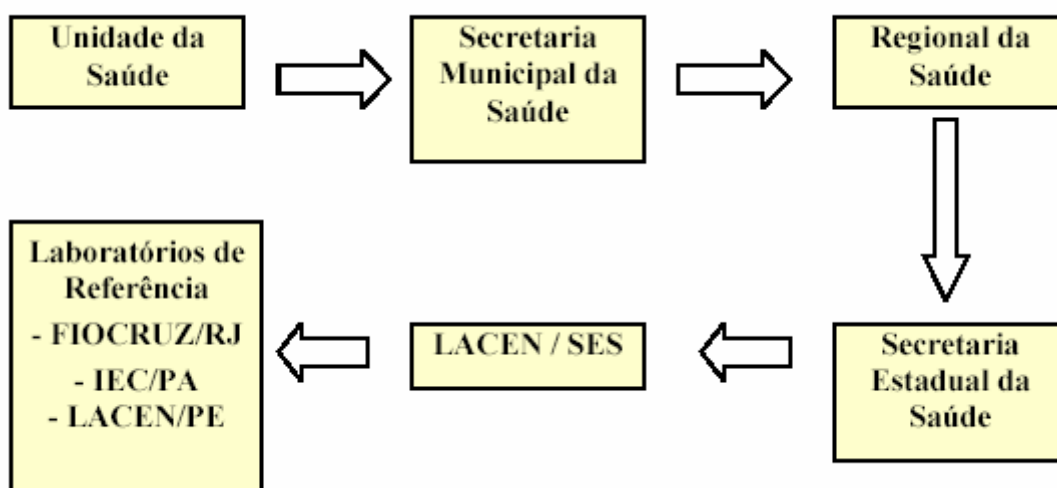


FIGURA 7. Fluxograma de envio de amostras de fezes e resultados para pesquisa de enterovírus. FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz; LACEN: Laboratório Central; SES: Secretaria Estadual de Saúde; IEC: Instituto Evandro Chagas. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007.

### 1.10. Ações da Vigilância Sanitária

A Vigilância Sanitária é a forma mais completa de existência da saúde pública, pois suas ações, de natureza eminentemente preventiva, perpassam todas as práticas médico-sanitárias: promoção, proteção, recuperação e reabilitação da saúde. A Vigilância Sanitária atua sobre fatores de risco associados a produtos,

insumos, serviços relacionados com a saúde, com o ambiente e o ambiente de trabalho, com a circulação internacional de transporte, cargas e pessoas (COSTA & ROZENFELD, 2004).

Uma vez identificados os riscos, é preciso empreender ações de controle. Para tanto, além da legislação e da fiscalização, devem ser empregados múltiplos instrumentos tais como a comunicação e a educação sanitária, os sistemas de informação, o monitoramento da qualidade de produtos e serviços, a vigilância epidemiológica de eventos adversos relacionados às condições do trabalho e do ambiente e ao consumo de tecnologias médicas, de água e de alimentos (COSTA & ROZENFELD, 2004).

A identificação dos fatores de risco envolvidos na determinação das doenças, não só as infecto-contagiosas, mas principalmente as crônico-degenerativas, que passam a ocupar um lugar predominante no perfil epidemiológico das populações em sociedades industriais, vêm provocando a modernização das estratégias de ação no campo da saúde pública. Essa modernização se dá tanto pela ampliação e diversificação do seu objeto quanto pela incorporação de novas técnicas e instrumentos de geração de informações e organização das intervenções sobre “danos”, “indícios de danos”, “riscos” e “condicionantes e determinantes” dos problemas de saúde (TEIXEIRA; PAIM & VILLASBÔAS, 2004).

Assim sendo, além da ampliação do objeto dos “programas de controle” que tendem a ultrapassar o limite estreito das doenças infecciosas e parasitárias, e se dirigem a grupos populacionais expostos a riscos diferenciados de adoecer e morrer, como os programas de saúde materno-infantil, do trabalhador, do idoso, vem se observando ainda, notadamente a partir dos anos 70, a formulação e a implementação de propostas dirigidas à montagem de “sistemas de vigilância epidemiológica”, cuja tradução operacional pretende ser uma ampla rede de unidades geradoras de dados que permitam a adoção de decisões, a execução de ações de investigação e de controle e a visualização do impacto das doenças e de seus agentes sobre a saúde da população (TEIXEIRA; PAIM & VILLASBÔAS, 2004).

A institucionalização dos programas de erradicação e controle e a implantação da vigilância no Brasil ao longo dos últimos noventa anos implicaram, do ponto de vista político-institucional, na organização centralizada de órgão e departamentos responsáveis pelas campanhas e programas (TEIXEIRA; PAIM & VILLASBÔAS, 2004).

Com as campanhas de erradicação de diversas doenças infecciosas, iniciadas após a segunda guerra mundial, a vigilância deixou de ser feita sobre as pessoas (doentes e contatos) e passou a ter como objeto, a doença. Consolidou-se, assim, a idéia de vigilância epidemiológica como observação ativa e sistemática da distribuição da ocorrência de agravos, a avaliação da situação epidemiológica com base na análise das informações obtidas, e a definição das medidas de prevenção e controle pertinentes. O conjunto de atividades de vigilância epidemiológica configura um sistema, em geral voltado para agravos específicos, cujo objetivo final é a prevenção, e constitui um instrumento indispensável à elaboração, ao acompanhamento e à avaliação de programas de saúde (PALMEIRA, 2004).

Para que a Vigilância Epidemiológica se operacionalize há um ciclo de funções específicas e intercomplementares que devem ser desenvolvidas de forma contínua, propiciando que a cada momento se conheça o comportamento epidemiológico da doença ou agravo sob vigilância, com a finalidade de se traçar medidas de intervenção oportunas e eficazes (ALVANHAN et al, 2000).

Este ciclo de funções compreende (ALVANHAN et al, 2000):

- coleta de dados (investigação epidemiológica);
- processamento dos dados coletados;
- análise e interpretação dos dados coletados;
- recomendação das medidas de controle apropriadas;
- promoção das ações de controle indicadas;
- avaliação da eficácia e efetividade das medidas adotadas;
- divulgação de informações pertinentes.

Segundo o Guia de Vigilância Epidemiológica (BRASIL, 2002), são imprescindíveis o planejamento e a execução do Programa de Investigações Epidemiológicas de Casos e Epidemias, que tem como objetivos: identificar fonte e modos de transmissão; grupos expostos a maior risco; fatores determinantes; confirmar o diagnóstico; e determinar as principais características epidemiológicas, orientando medidas de controle para impedir a ocorrência de novos casos.

Dentre as medidas adotadas frente a um caso ou epidemia de alguma doença estão a assistência médica ao(s) paciente(s); proteção do restante da população; e a execução de um roteiro de investigação de casos, que inclui etapas de confirmação do diagnóstico da doença e confirmação da epidemia, coleta de dados sobre o(s) caso(s), busca de evidências sobre fonte de contágio, período de duração da epidemia, modos de transmissão, distribuição geográfica da epidemia, atributos dos



grupos envolvidos, como faixa etária, sexo e grupo social e verificação de fatores de risco. Outras etapas são a busca ativa de casos e o processamento e análise dos dados para elaboração de um relatório da investigação (BRASIL, 2002).

A Portaria 1943 de 18 de outubro de 2001 define, como parte do programa de vigilância epidemiológica, a identificação compulsória das seguintes doenças à Fundação Nacional de Saúde (FUNASA): *“Art. 2.º Deverão ser notificados de forma imediata às Secretarias Estaduais de Saúde e estas deverão informar a FUNASA imediatamente após a notificação os casos suspeitos de botulismo, carbúnculo ou “antraz”, cólera, febre amarela, febres hemorrágicas de etiologia não esclarecida, hantavíroses, paralisia flácida aguda, peste, raiva humana, tularemia e varíola e os surtos ou agregação de casos ou óbitos de agravos inusitados, difteria, doença de etiologia não esclarecida e doença meningocócica.”* (BRASIL, 2001).

Enquanto não for alcançada a erradicação em escala mundial, a persistência dos casos de poliomielite em outros continentes, associada ao permanente risco de importação do vírus, justifica a continuidade dos dias nacionais de vacinação como estratégia para o fortalecimento da vigilância epidemiológica das paralisias flácidas agudas. As estratégias fundamentais para manutenção da erradicação são o alcance de coberturas vacinais adequadas de forma homogênea em todo o território nacional e o cumprimento de metas adequadas dos indicadores de vigilância epidemiológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A suspeita de poliomielite em indivíduos de qualquer idade e as PFAs em menores de 15 anos é de notificação e investigação obrigatória, como já relatado anteriormente. Para a detecção de casos de poliomielite em tempo hábil, o sistema de vigilância epidemiológica deve ser suficientemente sensível e ágil. A Secretaria de vigilância em saúde do Ministério da Saúde, objetivando garantir diagnóstico seguro e oportuno de uma provável reintrodução e disseminação do *Poliovirus* selvagem em território brasileiro, tem investido continuamente na sensibilização da vigilância epidemiológica das paralisias flácidas agudas no país, capacitando e atualizando os profissionais que atuam no setor, aperfeiçoando os registros, as investigações e as conclusões de cada caso. Atualmente, as unidades federadas contam com o apoio direto do âmbito federal e com grupos técnicos assessores mais próximos, inteiramente dedicados ao acompanhamento das ações e ao cumprimento de metas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Dentro do aspecto do trabalho respaldado por evidências científicas, a discussão sobre o papel dos laboratórios deve ser aprofundada na perspectiva da

estruturação e manutenção de uma rede com tecnologias recentes e adequadas aos diversos objetos de regulação e da retroalimentação dos conhecimentos e informações neles produzidas aos demais componentes do sistema nacional de vigilância sanitária. Dessa forma, considera-se essencial a necessidade do desenvolvimento de estudos e pesquisas, de forma contínua e sistemática, acerca das tecnologias, produtos, serviços e ambientes de interesse à saúde, considerando a relação risco-custo-benefício, acompanhando seus efeitos adversos e promovendo estratégias continuadas para o seu uso racional (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2006).

Portanto, o estudo detalhado em nível molecular, das amostras suspeitas de paralisia flácida certamente trará grandes benefícios para o nosso conhecimento acerca da epidemiologia molecular das infecções causadas por enterovírus, além de possibilitar o desenvolvimento de técnicas mais rápidas e sensíveis para o diagnóstico destes vírus o que vai de encontro com o proposto pela Lei nº 8080 (BRASIL, 1990) que estabelece as diretrizes para a vigilância em saúde onde estão incluídas as ações de vigilância sanitária e vigilância epidemiológica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar um protocolo de identificação rápida de enterovírus através da detecção, por RT-PCR, do genoma viral em primeira passagem de cultura de células da linhagem RD.

### **2.2. Objetivos específicos**

Analisar os perfis de idade, de sexo, da amostra oportuna (período entre aparecimento dos primeiros sintomas e coleta das amostras) e do estado/país dos casos suspeitos e confirmados de PFA.

Determinar, através do seqüenciamento nucleotídico, os sorotipos de enterovírus encontrados.

Comparar a taxa de isolamento obtida através do método padrão ouro do Laboratório de Enterovírus da Fundação Oswaldo Cruz com a identificação obtida através da detecção de genoma de enterovírus em amostras de primeira passagem em culturas celulares.

Determinar a sensibilidade e a especificidade da detecção de genoma de enterovírus das amostras de primeira passagem de cultura celular.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Amostras clínicas

Foram utilizadas 221 amostras fecais, escolhidas aleatoriamente, em ensaio cego. As amostras foram recebidas pelo Laboratório de Enterovírus (LEV) da FIOCRUZ, entre os meses de julho e novembro de 2007, para o diagnóstico de PFA. Como o LEV é credenciado pelo Ministério da Saúde como Centro de Referência Nacional para o Programa Vigilância dos casos de PFA, materiais clínicos provenientes de várias localidades nacionais e internacionais são recebidos para diagnóstico laboratorial das PFAs.

Somente após a obtenção dos resultados por RT-PCR, alguns aspectos dos pacientes como idade, sexo, amostra oportuna, e local de coleta foram analisados a partir das fichas epidemiológicas que chegaram ao LEV, recebidas junto com as amostras clínicas, permitindo traçar um perfil dos pacientes acometidos por PFA.

#### 3.2. Tratamento das amostras clínicas para obtenção da suspensão fecal

Em tubo de centrífuga cônico de 15 mL (*Falcon*), foram adicionados cerca de 2 g de fezes, 1 g de pérolas de vidro, 8 mL de meio mínimo essencial (MEM) contendo antibióticos (penicilina a 200 U/ mL de meio e estreptomicina a 200 mg/ mL de meio) e 1,5 mL de clorofórmio (*Merck*). O tubo foi homogeneizado por 10 minutos (*Mistral Mixer Lab - Line*) e centrifugado por 20 minutos a 8500 x g a 4°C em centrífuga refrigerada (*Microprocessada CT 5500DR*). Decorrido o tempo de centrifugação, 1 mL do sobrenadante foi transferido para microtubo de 1,5 mL e armazenado a 4°C para posterior inoculação nas culturas celulares.

#### 3.3. Linhagens celulares

Dois tipos de linhagens celulares são empregados pelos laboratórios da rede da OMS, em todo o mundo, na vigilância de PFA, dentro do Programa Global de Erradicação da Poliomielite: RD - células diplóides de rabdiosarcoma embrionário humano – célula sensível ao isolamento de *Poliovirus*, *Echovirus*, vários sorotipos de *Coxsackievirus* do grupo A e do grupo B, e L20B - linhagem celular transgênica derivada de células L de camundongo, que expressa receptores para os *Poliovirus*.

As células foram fornecidas pelo CDC (*Center for Disease Control and Prevention*, Atlanta, USA) ao Laboratório de Enterovírus da Fiocruz/RJ.

Apesar dos laboratórios da rede da OMS empregarem estes dois tipos de linhagens celulares no diagnóstico de paralisias flácidas agudas, o presente trabalho utilizou apenas o isolamento viral na linhagem de células RD, pois esta, como já foi dito, é sensível a vários enterovírus e não somente aos *Poliovirus*.

As monocamadas celulares foram mantidas e propagadas em garrafas de poliestireno (75 cm<sup>2</sup>, *Nalgene*) transparentes, estéreis, descartáveis, em meio Eagle Earle de crescimento (acrescido de 10 mL de glutamina a 2% - *Sigma*; HEPES 0,01M - *Gibco*; bicarbonato de sódio 0,1% e soro fetal bovino 5% - Life Technologies) e incubadas a 37°C. As células foram observadas ao microscópio invertido (*Hund Wetzear*) até a formação da monocamada completa.

Para a preparação dos tubos de células para o isolamento viral, o meio das garrafas contendo a monocamada celular foi desprezado e 2 mL de solução de tripsina-verseno 0,25% (*Sigma*) foram adicionados. A solução de tripsina-verseno permaneceu em contato com a monocamada celular até que esta se desprendesse da parede da garrafa. O meio tripsina-verseno foi então desprezado e a monocamada celular homogeneizada com meio mínimo essencial com sais de Earle acrescido de soro fetal bovino nas concentrações de 5%. As monocamadas foram cultivadas em tubos transparentes para cultura de células, estéril, descartável de 15 mm x 160 mm em poliestireno (*Nalgene*) com a adição de 2 mL desta suspensão celular, contendo aproximadamente 200.000 células.

Após 24 horas de incubação a 37°C, as células foram observadas ao microscópio invertido e as que apresentaram monocamada confluyente foram utilizadas para a inoculação das amostras.

### **3.4. Isolamento viral**

O meio de crescimento de cada tubo contendo a monocamada celular foi descartado e 1,8 mL de meio nutriente, constituído por meio Mem-Eagle Earle, contendo 2% de soro fetal bovino foi adicionado. Em seguida, 0,2 mL de suspensão fecal foi acrescentado. Para cada grupo de amostras inoculadas, um controle de célula (tubo não inoculado) foi incluído, servindo como padrão de controle negativo. As culturas celulares inoculadas foram mantidas a 37°C e submetidas a leituras diárias, com o auxílio de um microscópio invertido (*Nikon*, TS100), por cinco dias

consecutivos. Todas as amostras de primeira passagem foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento rápido, em gelo seco e álcool etílico, visando à liberação das partículas virais para uma nova inoculação (segunda passagem em cultura celular) e leitura diária antes do resultado final ser liberado. Decorrido o tempo de leitura dos tubos, todas as amostras foram mantidas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5. Extração do RNA viral

Somente as amostras de primeira passagem de isolamento viral foram submetidas à extração do RNA viral com o uso de partículas de dióxido de silício de acordo com o protocolo do fabricante (*NucliSens Isolation Reagents*- bioMérieux). Este método baseia-se na propriedade do isotiocianato de guanidina lisar células e inativar nucleases, juntamente com a propriedade de ligação das partículas de dióxido de silício com as moléculas de ácidos-nucleicos (BOOM et al, 1990).

Em um microtubo de 1,5 mL foram acrescentados 400  $\mu\text{L}$  da amostra inoculada em primeira passagem de cultura celular juntamente com 800  $\mu\text{L}$  do tampão L6 (tampão de lise- isotiocianato de guanidina). A mistura foi homogeneizada por 2 minutos (*TOMY Microtube Mixer MT 360*) e mantida em temperatura ambiente por 15 minutos. Foram acrescentados 15  $\mu\text{L}$  de dióxido de silício e os tubos foram homogeneizados em posição horizontal por 20 minutos a 1200 rpm (*Thomas Scientific Micro Shaker 60*), sendo, então, centrifugados a 12000 x g por 30 segundos (*Eppendorf Centrifuge 5415D*).

O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e ao precipitado foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  do tampão de lavagem L2. A mistura foi novamente homogeneizada (*TOMY Microtube Mixer MT 360*) para ressuspender a sílica e centrifugada a 12000 x g por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado e novamente foi acrescentado o mesmo volume de L2 em cada amostra. As etapas de homogeneização e centrifugação foram repetidas mais uma vez e os sobrenadantes descartados.

Foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado (*Merck*) e a mistura foi homogeneizada, centrifugada a 12000 x g por 30 segundos e o sobrenadante descartado. Ao precipitado foram acrescentados novamente 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado e as etapas de homogeneização e centrifugação foram repetidas mais uma vez.

Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de acetona gelada (*Isofar*) a cada amostra. A solução foi novamente homogeneizada e centrifugada por 30 segundos a 12000 x g. O sobrenadante foi descartado e os tubos contendo os precipitados foram colocados em banho seco (*Mult-Blok Heater*) a 55 °C até que toda a acetona tivesse evaporado. Após a secagem do precipitado, foram acrescentados a cada amostra 50  $\mu\text{L}$  de tampão de eluição. A mistura foi então homogeneizada delicadamente e centrifugada por 30 segundos a 12000 x g. O sobrenadante foi cuidadosamente pipetado e colocado em um microtubo de 500  $\mu\text{L}$  devidamente identificado. Cada amostra teve então seu volume reduzido em pressão negativa (*Speed Vac SVC 100 Savant*) até que atingisse 9  $\mu\text{L}$  e o ácido desoxirribonucléico complementar (c –DNA) sintetizado imediatamente após .

### 3.6. Síntese do c-DNA (RT-PCR)

Nesta etapa, o RNA extraído a partir da suspensão celular foi transcrito em cDNA de acordo com a seguinte reação: em um microtubo de 200  $\mu\text{L}$  foram adicionados 9  $\mu\text{L}$  do RNA extraído e 100 pmoles/ $\mu\text{L}$  de *Random-primer* (Promega). O tubo foi centrifugado rapidamente (*Fanem Centrimicro MOD 212*) e levado ao termociclador (*GeneAmp PCR System 2400 Applied Biosystems*) onde foi incubado a 70 °C por 10 minutos. O tubo contendo a mistura foi levado para um banho de gelo e em seguida foram adicionados 4  $\mu\text{L}$  de 5X *first strand buffer* concentrado (*Invitrogen*), 2  $\mu\text{L}$  de Di-Thio-Treitol 0,1 M (*DTT, Invitrogen*), 1,5  $\mu\text{L}$  de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) 10mM (*Gibco*), 20 U de inibidor de RNase (*RNAse out Ribonuclease Inhibitor Recombinant, Invitrogen*), e 1  $\mu\text{L}$  de água deionizada autoclavada. As amostras foram incubadas novamente em termociclador a 42°C por 2 minutos. Após incubação, foram adicionadas 100 U de transcriptase reversa (*SuperScript II Reverse Transcriptase, Invitrogen*), resultando em um volume final de 20  $\mu\text{l}$ . A reação foi submetida à nova incubação a 42°C por 50 minutos em termociclador. As amostras de cDNA obtidas foram estocadas à -20°C até seu uso nas reações de RT-PCR.

### 3.7. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada acrescentado, em um microtubo de 200  $\mu$ L, 5  $\mu$ L de cDNA de cada amostra, 25  $\mu$ L de PCR *Master Mix* 2X (*Taq* DNA polimerase 1,25 U; 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 mM de  $MgCl_2$ ), 18  $\mu$ L de água deionizada e autoclavada (*Nuclease Free Water* - Promega), 50 pmoles do *primer reverse* 222 e 50 pmoles do *primer forward* 292. Este par de *primers* se liga a uma região do gene que codifica a VP1, gerando um fragmento de 357 pares de base (pb). As seqüências dos primers e sua posição de ligação no genoma viral estão no QUADRO 3. Foi utilizado um controle negativo (todos os reagentes, sem o material genético) e não foi utilizado nenhum controle positivo para evitar contaminação.

QUADRO 3. Descrição das seqüências dos *primers* utilizados e sua posição de ligação no genoma viral.

| Primer | Seqüência                 | Posição do genoma* |
|--------|---------------------------|--------------------|
| 222    | 5' CICCIGCIGGIAYRWACAT 3' | 2969 - 2951        |
| 292    | 5' MIGCIGYIGARACNGG 3'    | 2612 - 2627        |

I: Inosina; Y: C / T; W: A / T; M: A / C; R: A / G; N: A / C / G / T). \* numeração baseada na cepa padrão de *Poliovirus* Mahoney (OBERSTE et al, 2000; OBERSTE et al, 2003a).

Os microtubos foram levados ao termociclador (*GeneAmp PCR System 2400 Applied Biosystems*) e submetida a 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 42°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos além de uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

As reações de PCR foram acompanhadas por um controle negativo (água estéril) para descartar qualquer possível contaminação.

### 3.8. Visualização do produto amplificado em gel de agarose

Para visualização dos produtos da PCR, as amostras (50  $\mu$ L, divididos em 2 poços estreitos) foram acrescidas de 8  $\mu$ L de *Loading buffer* 6X e aplicadas em gel de agarose a 1%, em tampão TAE (Tris-Acetato) 1X, contendo brometo de etídio (1  $\mu$ L da solução estoque 10 mg/mL), utilizando marcador de peso molecular 50 pb



(*DNA Ladder* 1 $\mu$ g/  $\mu$ L – Invitrogen) como referência. A corrida de eletroforese foi realizada a 130 V (*Power Pac Basic BioRad*) em tampão TAE 1X por 30-40 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em transiluminador (*Fotodyn Incorporate*) e os resultados fotodocumentados em máquina fotográfica (*Polaroid CU-5 88-46*) com abertura de 5.6 e tempo de exposição de 1 segundo em filme Polaroid 667.

### **3.9. Purificação do ácido desoxirribonucléico - DNA**

Os produtos da PCR compatíveis com o tamanho esperado (357 pb) foram extraídos do gel de agarose, purificados com o uso do Kit "*QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction*" (*Quiagen*), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

As bandas de interesse (357 pb) foram cortadas dos géis com ajuda de um bisturi, pesadas e transferidas para tubos de 1,5 mL, onde foram adicionados tampão de solubilização (QG, na proporção de 300  $\mu$ L/100 mg de gel). Seguiu-se um período de incubação por 10 minutos a 50 °C em termobloco (*Mult-Blok Heater*), com agitação a intervalos de 3 minutos. Após total solubilização, a cor da mistura foi verificada para certificar que o pH estivesse menor que 7,5 e foi acrescentado 200  $\mu$ L de isopropanol absoluto (*Merck*) para garantir um maior rendimento durante a purificação. A mistura foi então colocada na coluna disposta sobre os tubos coletores de 2,0 mL, centrifugados por 1 minuto a 17.900 x g (*Eppendorf Centrifuge 5415D*) e o filtrado foi descartado. Foram adicionados mais 200  $\mu$ L de tampão QG para remover todo o resíduo da agarose, seguido de centrifugação por 1 minuto a 17.900 x g e o filtrado descartado.

O procedimento baseia-se na capacidade de ligação do DNA na coluna, pela qual a amostra passou durante o procedimento de purificação. Após a retenção do DNA na coluna, foram adicionados 500  $\mu$ L de tampão de lavagem (PE), seguido de centrifugação a 17.900 x g por 1 minuto e o filtrado descartado. Para garantir que todo resíduo de etanol do tampão PE fosse removido, a coluna foi novamente centrifugada e a mesma colocada em um tubo de 1,5 mL estéril e identificado. Para a eluição do DNA, agora purificado, foram realizadas duas etapas de lavagem, a primeira adicionando-se 50  $\mu$ L de tampão de eluição e centrifugando a 17.900 g por 1 minuto e a segunda adicionando-se 30 $\mu$ L de tampão de eluição, incubando por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugando novamente a 17.900 x g por 1 minuto. A coluna foi descartada e o filtrado foi concentrado para o volume de 15  $\mu$ L

sob pressão negativa em aparelho Speed Vac SVC 100 (*Savant. Instruments*) e estocado à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.10. Quantificação da massa de DNA

Os produtos de PCR eluídos do gel foram, então, quantificados através da comparação, em gel de agarose 1%, com padrão marcador de massa molecular *Low DNA Mass Ladder*. Para essa quantificação foi utilizada uma mistura de 4  $\mu\text{L}$  do DNA purificado, 2  $\mu\text{L}$  de *Loading buffer* 6X e 6  $\mu\text{L}$  de água deionizada autoclavada. As amostras foram aplicadas, juntamente com o padrão marcador de massa molecular preparado da mesma forma que as amostras, em gel de agarose 1% preparado com tampão TAE 1X corado com brometo de etídio (1  $\mu\text{L}$  da solução estoque 10 mg/ mL).

A intensidade da banda de cada produto foi avaliada por comparação com o padrão de marcador de massa molecular indicando a concentração de DNA contida em cada amostra.

A corrida através de eletroforese foi realizada a 130 Volts (*Power Pac Basic BioRad*) em tampão TAE 1X por 30-40 minutos. As bandas esperadas foram visualizadas em transiluminador (*Fotodyn Incorporate*) e os resultados fotodocumentados em máquina fotográfica (*Polaroid CU-5 88-46*) com abertura de 5.6 e tempo de exposição tempo de 1 segundo em filme Polaroid 667.

### 3.11. Reações cíclicas de seqüenciamento (*Cycle Sequencing*)

As quantidades de DNA utilizadas para as reações de *cycle-sequencing* foram padronizadas em função do tamanho do fragmento. No caso do *primer* utilizado neste trabalho, 100-120 ng de DNA foram suficientes para dar um sinal que seja detectável pelo laser do seqüenciador. Utilizou-se o kit *ABI BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1*, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (*Applied-Biosystems*). O fundamento do método de seqüenciamento do kit utilizado é baseado na marcação com fluorescência dos dideoxynucleotídeos (ddNTPs) incorporados às cadeias de DNA com tamanhos variáveis formadas durante a reação. Na reação, foi utilizada uma mistura dos seguintes reagentes: 5 pmoles do *primer* reverso 222, 3  $\mu\text{L}$  do *Big Dye terminator 5X sequencing buffer*, 2  $\mu\text{L}$  do *Big Dye terminator v3.1 cycle sequencing* (*Taq* DNA Polimerase, dNTP's,

ddNTP's marcados,  $MgCl_2$  e Tris-HCl pH 9,0), e o DNA, na concentração de 100 a 120 ng. Estas reações foram realizadas em termociclador (*GeneAmp PCR System 2400 Applied Biosystems*), com 25 ciclos de 96°C por 15 segundos, 42°C por 30 segundos e 60°C por 3 minutos.

### 3.12. Purificação dos produtos de *Cycle Sequencing*

Ao final da reação de *cycle-sequencing*, os produtos foram purificados por precipitação com álcool isopropílico. Os produtos foram transferidos para microtubos de 1,5 mL onde foram adicionados 80  $\mu$ L de isopropanol 75% (*Merck*). A mistura foi homogeneizada (*Mistral Mixer Lab – Line*) e deixada em repouso a temperatura ambiente e no escuro por 20 minutos para a precipitação do produto.

Após centrifugação por 20 minutos a 17.900 x g (*Eppendorf Centrifuge 5451R*), o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e 250  $\mu$ L de isopropanol a 75% foram adicionados, homogeneizando rapidamente o tubo e realizando-se mais uma centrifugação, por 5 minutos a 17.900x g. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e o conteúdo dos tubos foi seco sob pressão negativa em aparelho Speed Vac SVC 100 (*Savant. Instruments*) e estocados a -20°C para posterior análise.

### 3.13. Determinação da Identidade Viral

As amostras purificadas foram ressuspensas em 20  $\mu$ L de tampão TRS (*Template Supression Reagent – Applied Biosystems*), homogeneizadas por 10 minutos (*Tomy microtubo mixer MT 360*) e aquecidas a 95°C em termobloco (*Multi-Blok Heater*) por 3 minutos para desnaturação, evitando a formação de estruturas secundárias. As amostras foram imediatamente colocadas em banho de gelo até serem analisadas.

As seqüências nucleotídicas obtidas nas reações de *cycle – sequencing* foram analisadas em seqüenciador automático (PE 310 *Genetic Analyser*) e editadas, quando necessário, utilizando o programa Bio – Edit 7.0. Posteriormente, elas foram comparadas com o banco de dados contido no *GenBank* através do programa Blast, para a determinação do sorotipo e determinação da identidade viral.

### **3.14. Comparação entre os resultados obtidos por RT-PCR e os resultados do método padrão ouro utilizado no Laboratório de Enterovírus**

Os resultados obtidos através da RT-PCR e seqüenciamento das amostras de primeira passagem em cultura celular foram comparados ao método padrão ouro realizado pelo LEV.

Os dados do LEV utilizados para comparação foram a presença de efeito citopático em culturas da linhagem de células RD tanto em primeira quanto em segunda passagem e o resultado obtido através da PCR utilizada na rotina.

### **3.15. Cálculo da taxa de isolamento**

A taxa de isolamento foi calculada através da medida da porcentagem entre todas as amostras analisadas e as amostras positivas (independentemente do resultado do seqüenciamento). Esta taxa foi comparada a do LEV entre os meses de julho e novembro de 2007, levando em consideração tanto o isolamento em linhagem de células RD quanto o isolamento total feito em todas as culturas celulares realizados no laboratório, e com a taxa de isolamento total obtida durante todo o ano de 2007.

### **3.16. Cálculo de especificidade e sensibilidade das análises**

A sensibilidade é a proporção de verdadeiros positivos entre todas as amostras analisadas. Expressa a probabilidade de um teste dar positivo na presença da doença, isto é, avalia a capacidade do teste de detectar a presença da doença quando de fato ela está presente. A especificidade é a proporção de verdadeiros negativos entre todos os indivíduos sadios. Expressa a probabilidade de um teste dar negativo na ausência da doença, isto é, avalia a capacidade do teste afastar a doença quando de fato ela está ausente. Um teste muito sensível raramente deixa de diagnosticar indivíduos com a doença e um teste muito específico raramente classificará como doente um indivíduo sem a doença (MEDRONHO & PEREZ, 2006).

Os cálculos de sensibilidade e especificidade foram realizados de acordo com a TABELA 1 utilizada para a comparação de dois testes diagnósticos (MEDRONHO & PEREZ, 2006). Foram comparados os resultados obtidos através do método

Padrão Ouro realizado pelo LEV (isolamento viral em cultura celular) com os resultados obtidos através da RT-PCR das amostras de primeira passagem, e o isolamento viral somente em linhagem de células RD do LEV com os resultados obtidos através da RT-PCR das amostras de primeira passagem.

TABELA 1. Tabela utilizada para cálculo de sensibilidade e especificidade através da comparação dos resultados obtidos por duas técnicas de diagnósticos distintas.

| Método<br>Teste<br>(RT- PCR<br>de 1ª<br>passagem) | Padrão Ouro (Isolamento viral) |                         |                         | Total   |
|---|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------|
|   |                                | Positivo                | Negativo                |         |
|   | Positivo                       | a (verdadeiro positivo) | b (falso positivo)      | a+b     |
|   | Negativo                       | c (falso negativo)      | d (verdadeiro negativo) | c+d     |
|   | Total                          | a+c                     | b+d                     | a+b+c+d |

Onde: a: número de amostras positivas para o padrão ouro e para o método teste. b: número de amostras positivas para o padrão ouro e negativas para o método teste. c: número de amostras negativas para o padrão ouro e positivas para o método teste. d: número de amostras negativas para o padrão ouro e para o método teste.  
Fonte: MEDRONHO & PEREZ, 2006.

De acordo com Medronho e Perez (2006), os cálculos de sensibilidade e especificidade são feitos como descrito a seguir:

Cálculo da sensibilidade: 
$$S = \frac{a}{a+c}$$

Onde: S = sensibilidade; a = número de verdadeiros positivos; c = número de falsos negativos.

Cálculo de especificidade: 
$$E = \frac{d}{b+d}$$

Onde: E = especificidade; d = número de verdadeiros negativos; b = número de falsos positivos.

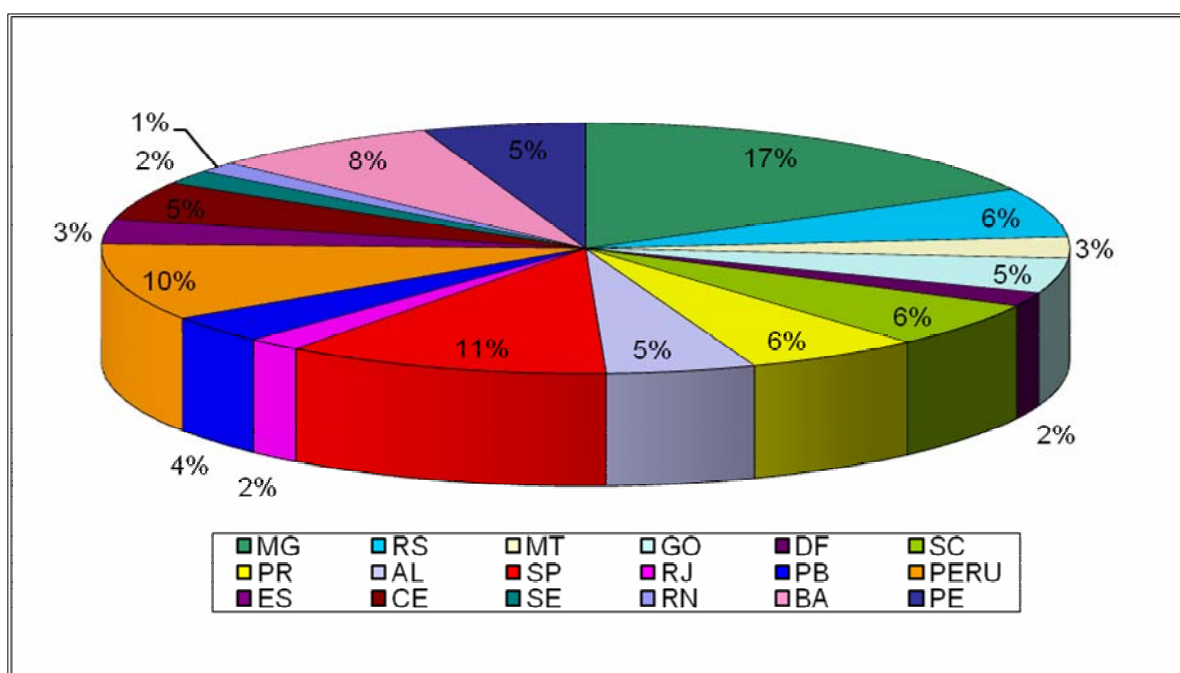
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Perfil das amostras analisadas

Durante o ano de 2007, o LEV recebeu um total de 537 amostras de pacientes com casos diagnosticados de PFA. Entre os meses de julho e novembro de 2007, foram recebidas 263 amostras. Destas, 221 escolhidas aleatoriamente foram analisadas quanto à idade dos pacientes, sexo, amostras oportunas (intervalo entre o aparecimento dos primeiros sintomas e a coleta das amostras) e localidade onde foram coletadas. Todos os pacientes possuíam suspeita de PFA, entretanto, nem todos apresentaram suas fichas epidemiológicas devidamente preenchidas.

As amostras, escolhidas seguiram o seguinte perfil de acordo com a distribuição segundo a localidade da coleta: 38 foram provenientes de Minas Gerais (17%), 7 do Espírito Santo (3%), 4 do Rio de Janeiro (2%), 24 de São Paulo (11%), 13 de Santa Catarina (6%), 14 do Rio Grande do Sul (6%), 13 do Paraná (6%), 6 do Mato Grosso (3%), 10 de Goiás (5%), 4 do Distrito Federal (2%), 11 de Alagoas (5%), 8 da Paraíba (4%), 11 do Ceará (5%), 4 de Sergipe (2%), 3 do Rio Grande do Norte (1%), 17 da Bahia (8%), 12 de Pernambuco (5%) e 22 do Peru (10%) (GRÁFICO 4).

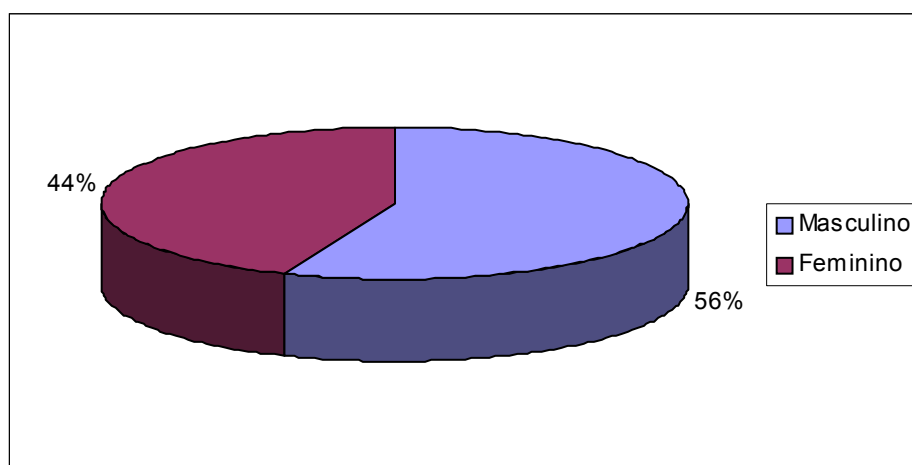
GRÁFICO 4. Distribuição das amostras analisadas com suspeita de Paralisia Flácida Aguda (PFA) em função do local de coleta.



O cálculo do valor médio da idade foi feito utilizando os dados das fichas de 209 pacientes (94,6%), devidamente preenchidas com esta informação. A idade média dos pacientes foi de 6,1 anos, com idade máxima de 14 anos e mínima de 3 meses. O valor modal, em relação à idade foi de 2 anos (32 repetições). Quando comparadas as idades entre indivíduos de diferentes sexos, observou-se para indivíduos do sexo masculino uma média de 6 anos e para os do sexo feminino uma média de 6,1 anos.

Quanto ao sexo, observou-se que 97 amostras (44%) eram de indivíduos do sexo feminino, 124 (56%) do sexo masculino (GRÁFICO 5). Para este cálculo, foram utilizadas as 221 amostras.

GRÁFICO 5. Distribuição das amostras analisadas com suspeita de Paralisia Flácida Aguda (PFA) em função do sexo do paciente.



Na análise do perfil de amostra oportuna verificou-se uma maior deficiência quanto ao preenchimento da ficha epidemiológica, tendo sido observado que somente 178 amostras apresentaram este dado. O estado/ país que apresentou o maior índice de não preenchimento foi o Peru (todas as suas 22 amostras vieram sem esta informação), seguido de Pernambuco (10 das 12 amostras não continham esta informação). Observou-se um valor médio de 13,3 dias, com valor máximo de 210 dias (aproximadamente 7 meses) e valor mínimo de 0 dias. O valor modal foi de 5 dias (10 repetições).

#### 4.2. Análise das amostras obtidas por RT-PCR

Das 221 amostras analisadas, 17 (7,7%) apresentaram resultados positivos para a amplificação do material genômico de enterovírus em primeira passagem da cultura celular. O perfil de bandas está demonstrado na FIGURA 8.

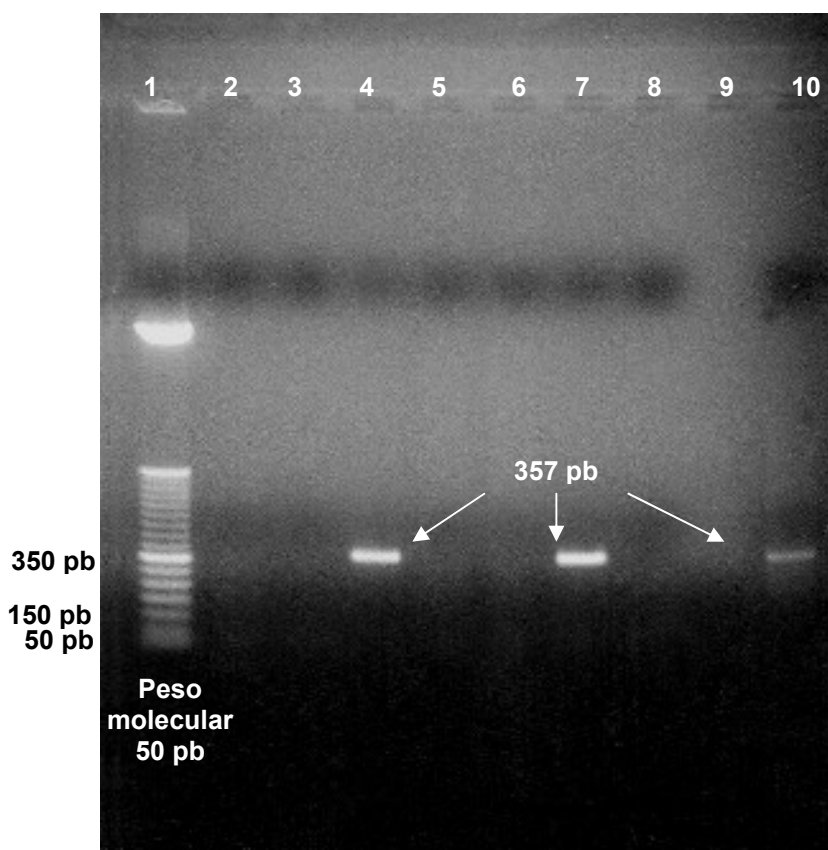


FIGURA 8. Perfil eletroforético, em gel de agarose a 1%, dos produtos da reação de PCR utilizando os *primers* específicos para enterovírus. Raia 1: Padrão de peso molecular de 50 pares de bases (*Invitrogen*), raia 2: amostra 37464, raia 3: amostra 37465, raia 4: amostra 37468 (positiva), raia 5: amostra 37469, raia 6: amostra 37470, raia 7: amostra 37471 (positiva), raia 8: controle negativo, raia 9: vazia, raia 10: amostra 37454 (positiva).

A média de idade dos pacientes entre as amostras positivas foi de 3,5 anos, com valor máximo de 9 anos e mínimo de 1. O valor modal também foi de 2 anos (6 repetições). Quanto ao sexo, a maior frequência foi observada em indivíduos do sexo feminino (9 amostras- 53%).

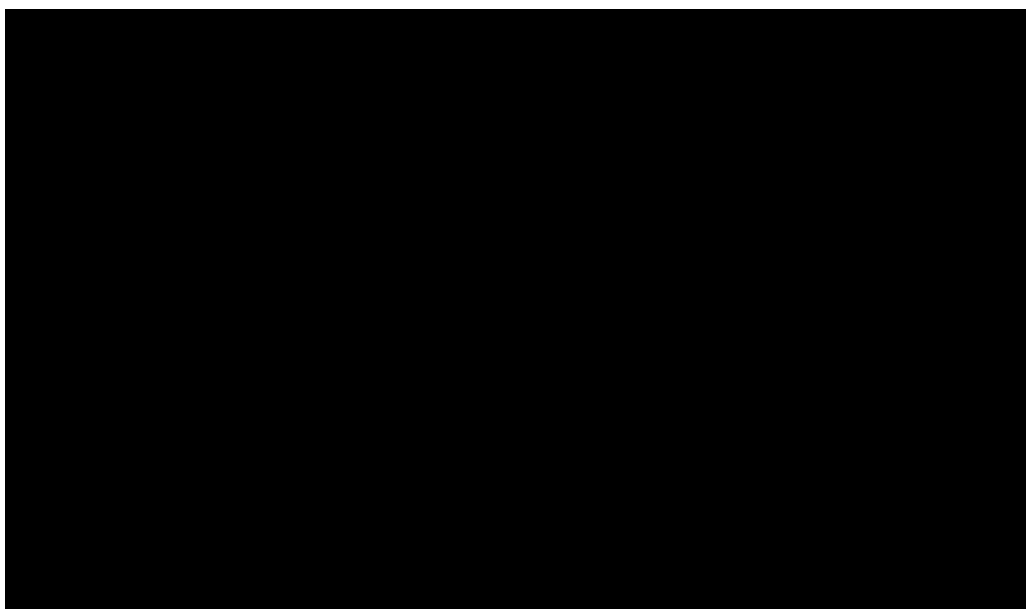
Comparando o intervalo entre o aparecimento dos primeiros sintomas e a coleta das amostras, observou-se uma média de 10,7 dias. O valor máximo



observado foi de 40 dias para duas amostras e o valor mínimo de 1 dia. O valor modal foi de 9 dias (2 repetições). Estes cálculos foram realizados com a informação contida em apenas 14 fichas, das 17 amostras que se apresentaram positivas na PCR.

A distribuição das amostras positivas segundo a origem da coleta está demonstrada no GRÁFICO 6. Foram observadas amostras positivas em 11 dos 14 estado/país analisados, sendo Minas Gerais o que apresentou maior frequência.

GRÁFICO 6. Distribuição, em função do local de coleta, das amostras positivas para RT-PCR para detecção de enterovírus em amostras de primeira passagem em cultura de células da linhagem RD.



#### 4.3. Resultado do seqüenciamento nucleotídico

Foi possível obter o seqüenciamento nucleotídico em somente 14 amostras das 17 positivas. A identificação dos sorotipos e a porcentagem de identidade dos seqüenciamentos nucleotídicos estão demonstradas na TABELA 2.

Observou-se maior frequência de *Coxsackievirus* B3 (3 das 14 amostras seqüenciadas) e de *Echovirus* 7 (3 das 14 amostras seqüenciadas).

Quanto à distribuição dos sorotipos por estado/país, houve a identificação de duas amostras de *Echovirus* 7 na Bahia e 2 amostras de *Coxsackievirus* B3 em Santa Catarina.

TABELA 2. Resultado do seqüenciamento nucleotídico, identidade nucleotídica das amostras seqüenciadas, sexo e local da coleta de todas as amostras positivas para RT-PCR para detecção de enterovírus em primeira passagem da cultura de células da linhagem RD.

| <b>Amostra</b> | <b>Seqüenciamento nucleotídico</b> | <b>Identidade nucleotídica</b> | <b>Sexo</b> | <b>UF</b> |
|----------------|------------------------------------|--------------------------------|-------------|-----------|
| <b>36873</b>   | <i>Coxsackievirus</i> B3           | 90%                            | M           | AL        |
| <b>36918</b>   | Não funcionou                      | -                              | M           | CE        |
| <b>37214</b>   | <i>Poliovirus</i> 1                | 100%                           | F           | RS        |
| <b>37222</b>   | <i>Echovirus</i> 21                | 81%                            | M           | PERU      |
| <b>37242</b>   | Não funcionou                      | -                              | F           | MG        |
| <b>37276</b>   | <i>Echovirus</i> 7                 | 82%                            | M           | SE        |
| <b>37289</b>   | <i>Echovirus</i> 7                 | 82%                            | F           | BA        |
| <b>37348</b>   | <i>Echovirus</i> 30                | 92%                            | F           | RN        |
| <b>37350</b>   | <i>Echovirus</i> 6                 | 95%                            | M           | RS        |
| <b>37401</b>   | <i>Poliovirus</i> 3                | 98%                            | M           | MG        |
| <b>37402</b>   | <i>Coxsackievirus</i> B3           | 90%                            | F           | SC        |
| <b>37403</b>   | <i>Coxsackievirus</i> B3           | 90%                            | F           | SC        |
| <b>37424</b>   | <i>Echovirus</i> 11                | 93%                            | F           | PR        |
| <b>37454</b>   | Não funcionou                      | -                              | F           | GO        |
| <b>37468</b>   | <i>Coxsackievirus</i> B2           | 96%                            | F           | MG        |
| <b>37471</b>   | <i>Echovirus</i> 29                | 83%                            | M           | PERU      |
| <b>37508</b>   | <i>Echovirus</i> 7                 | 83%                            | M           | BA        |

#### **4.4. Comparação entre os resultados obtidos por RT-PCR e os resultados do método padrão ouro utilizado no Laboratório de Enterovírus**

Foi realizada a comparação entre os resultados obtidos através da RT-PCR das amostras de primeira passagem em cultura de células RD com o método padrão ouro realizado pelo LEV. Quatro das 17 amostras positivas (36873, 36918, 37222 e 37350) não apresentaram ECP característico na primeira passagem em cultura celular. Destas, somente 1 não foi identificada no seqüenciamento nucleotídico. Cinco das 17 amostras positivas (37242, 37402, 37403, 37454 e 37468) não apresentaram nenhum ECP nas duas passagens de cultura celular, sendo que somente 2 amostras não foram identificadas no seqüenciamento nucleotídico. A

análise das demais amostras confirmou os resultados obtidos pelo LEV. Os resultados estão descritos na TABELA 3.

TABELA 3. Comparação dos resultados obtidos pelo método padrão ouro (isolamento viral em duas passagens de célula RD e técnicas moleculares) realizado pelo Laboratório de Enterovírus com o resultado do seqüenciamento nucleotídico das amostras positivas para RT-PCR para a detecção de enterovírus em primeira passagem de cultura de células da linhagem RD.

| <b>Amostra</b> | <b>% de ECP em 1<sup>a</sup> passagem em cultura celular</b> | <b>% de ECP em 2<sup>a</sup> passagem em cultura celular</b> | <b>PCR LEV</b> | <b>Resultado Seqüenciamento</b> |
|----------------|--|--|----------------|---------------------------------|
| <b>36873</b>   | 0  | 100%   | NPEV           | Coxsackievirus B3               |
| <b>36918</b>   | 0  | 75%  | NPEV           | Não funcionou                   |
| <b>37214</b>   | 100%   | 100%   | PV1, PV2, PV3  | Poliovirus 1                    |
| <b>37222</b>   | 0  | 100%   | NPEV           | Echovirus 21                    |
| <b>37242</b>   | 0  | 0  | -              | Não funcionou                   |
| <b>37276</b>   | 100%   | 100%   | NPEV           | Echovirus 7                     |
| <b>37289</b>   | 100%   | 100%   | NPEV           | Echovirus 7                     |
| <b>37348</b>   | 100%   | 100%   | NPEV           | Echovirus 30                    |
| <b>37350</b>   | 0  | 100%   | NPEV           | Echovirus 6                     |
| <b>37401</b>   | 100%   | 100%   | PV3            | Poliovirus 3                    |
| <b>37402</b>   | 0  | 0  | -              | Coxsackievirus B3               |
| <b>37403</b>   | 0  | 0  | -              | Coxsackievirus B3               |
| <b>37424</b>   | 100%   | 100%   | NPEV           | Echovirus 11                    |
| <b>37454</b>   | 0  | 0  | -              | Não funcionou                   |
| <b>37468</b>   | 0  | 0  | -              | Coxsackievirus B2               |
| <b>37471</b>   | 100%   | 75%  | NPEV           | Echovirus 29                    |
| <b>37508</b>   | 100%   | 100%   | NPEV           | Echovirus 7                     |

Entre as demais 204 amostras analisadas e que foram consideradas negativas, somente uma não confirmou o resultado obtido pelo LEV. Esta amostra não apresentou ECP na primeira passagem, no entanto foi observado 100% de ECP na segunda passagem. A PCR realizada pela rotina do LEV na segunda passagem indicou a presença de NPEV. Entretanto, quando foi realizada a RT-PCR da primeira passagem, não foi observada nenhuma banda na altura esperada.

#### 4.5. Cálculo da Taxa de Isolamento

A taxa de isolamento utilizando a metodologia padrão ouro do LEV (isolamento viral em duas linhagens celulares) durante todo o ano de 2007 foi de 10% (536 amostras analisadas e 53 amostras positivas, tanto para *Poliovirus* quanto para outros NPEV). A taxa de isolamento entre os meses de julho e novembro de 2007 foi de 9,5% (263 amostras e 25 amostras positivas, tanto para *Poliovirus* quanto para outros NPEV). O cálculo feito apenas utilizando o isolamento viral em linhagem de células RD durante os meses de julho a novembro de 2007 foi de 7,98% (263 amostras analisadas e 21 amostras positivas, tanto para *Poliovirus* quanto para outros NPEV).

O cálculo da taxa de isolamento utilizando a RT-PCR das amostras de primeira passagem em RD foi de 7,69% (221 amostras analisadas e 17 positivas, tanto para *Poliovirus* quanto para outros NPEV).

#### 4.6. Cálculo da especificidade e da sensibilidade

A especificidade e a sensibilidade da RT-PCR em primeira passagem de cultura celular foram calculadas a partir da comparação entre os resultados obtidos com esta técnica com os resultados obtidos com o isolamento viral (padrão ouro utilizado no LEV). Na TABELA 4 estão dispostas as comparações entre os resultados obtidos pela RT-PCR e os resultados do isolamento viral realizado pelo LEV durante o período de julho a novembro de 2007.

TABELA 4. Comparação entre os resultados da RT-PCR em amostras de primeira passagem em cultura celular da linhagem RD com os resultados obtidos pelo isolamento viral utilizando a metodologia considerada padrão ouro realizada pelo Laboratório de Enterovírus.

| Método Teste<br>(RT-PCR de 1 <sup>a</sup><br>passagem) | Padrão Ouro (Isolamento viral) |          |          | Total |
|--|--------------------------------|----------|----------|-------|
|  |                                | Positivo | Negativo |       |
|  | Positivo                       | 12       | 5        | 17    |
|  | Negativo                       | 3        | 201      | 204   |
|  | Total                          | 15       | 206      | 221   |

A comparação entre os resultados obtidos pela RT-PCR das amostras de primeira passagem e o isolamento em cultura celular realizado pelo LEV aponta que das 221 amostras analisadas, 213 tiveram o mesmo resultado para ambas as análises (12 positivas e 201 negativas). A RT-PCR apresentou 5 falsos positivos e 3 falsos negativos. Estes resultados indicam uma especificidade de 80% e uma sensibilidade de 97%.

Na TABELA 5 estão dispostas as comparações entre os resultados da RT-PCR e os resultados do isolamento viral somente em cultura de células da linhagem RD realizado pelo LEV durante o período de julho a novembro de 2007.

TABELA 5. Comparação entre os resultados da RT-PCR em amostras de primeira passagem em cultura celular da linhagem RD com os resultados obtidos pelo isolamento viral em cultura de células da linhagem RD realizado pelo Laboratório de Enterovírus (padrão ouro).

| Método Teste<br>(RT-PCR de 1 <sup>a</sup><br>passagem) | Padrão Ouro (Isolamento viral RD) |          |          | Total |
|--|-----------------------------------|----------|----------|-------|
|  |                                   | Positivo | Negativo |       |
|  | Positivo                          | 12       | 5        | 17    |
|  | Negativo                          | 1        | 203      | 204   |
|  | Total                             | 13       | 208      | 221   |

A comparação entre os resultados obtidos pela RT-PCR das amostras de primeira passagem e o isolamento em cultura celular de células da linhagem RD realizado pelo LEV aponta que das 221 amostras analisadas, 215 tiveram o mesmo resultado para ambas as análises (12 positivas e 203 negativas). A RT-PCR apresentou 5 falsos positivos e somente 1 falso negativo. Estes resultados indicam uma especificidade de 92% e uma sensibilidade de 97%.

## 5. DISCUSSÃO

O processo de vigilância epidemiológica adotado no Brasil foi estabelecido por lei em 1999 e está descrito como: *“um conjunto de ações que proporciona o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção das doenças ou agravos”* (BRASIL, 2002).

Dentre os indicadores de vigilância epidemiológica para PFA, a prevalência mínima de casos foi considerada, no Brasil, como o indicador mais relevante. A monitoração pelo sistema hospitalar do SUS também tem auxiliado na busca ativa de casos PFA. A utilização do diagnóstico de internação facilitou a prospecção de casos, pois o cruzamento das informações deve ser mais uma ferramenta de vigilância para detectar prevalência mínima (TEIXEIRA-ROCHA & TAVARES NETO, 2003).

Entretanto, o que se observa na prática em termos de vigilância epidemiológica dos estados brasileiros é diferente. As fichas epidemiológicas, ferramentas utilizadas para o controle e monitoramento dos casos de PFA, muitas vezes não são preenchidas ou são indevidamente preenchidas. Das 221 amostras analisadas no presente trabalho, só houve o preenchimento adequado das fichas epidemiológicas em 174 amostras, ou seja, cerca de 20% delas não continham informações imprescindíveis para o Programa de Erradicação da Poliomielite tais como idade do paciente e o intervalo de tempo entre o aparecimento dos primeiros sintomas e a coleta das amostras. Desta forma, se faz necessária uma conscientização dos profissionais de saúde quanto ao preenchimento completo e correto da ficha epidemiológica, principalmente em relação à amostra oportuna e a idade que são variantes importantes no monitoramento dos casos de PFA.

Mesmo com a deficiência de dados, em média, as amostras oportunas (13,32 dias para todas as amostras e 10,7 dias para as amostras positivas) ainda estavam dentro do tempo ideal para o isolamento viral que é de 14 dias, assim como a média da idade (6,1 anos). Nenhum paciente apresentou idade maior que a de 15 anos, exigida pelo Programa de Vigilância Epidemiológica das PFA.

Ainda que a média do tempo da coleta das amostras estivesse dentro da ideal, houve a presença de algumas amostras (a maioria com resultado negativo) que se distanciaram muito da média observada, chegando a um valor máximo de

210 dias entre o aparecimento dos primeiros sintomas e a coleta. Amostras consideradas positivas como a 37424, cujo intervalo de tempo da coleta foi de 40 dias, não podem ter seu diagnóstico inicial relacionado com a presença do sorotipo de enterovírus encontrado. Apesar de existirem relatos da excreção dos enterovírus por até 16 semanas nas fezes, esta é feita durante as 2 primeiras semanas a partir do início dos primeiros sintomas (ROMERO, 1999). Portanto, o paciente em questão, que no início apresentava sintomas de PFA, pode ter sofrido, posteriormente, outra infecção (que pode ter sido assintomática), mas como a coleta da amostra foi feita no intervalo de tempo errado, foi diagnosticado como provocada por enterovírus.

A correlação entre o tipo de vírus/variante e os sintomas clínicos é bastante variável e pode depender das características dos hospedeiros, tais como uma exposição prévia a enterovírus e idade em que o paciente foi infectado (ITURRIZA-GÓMARA, MEGSON, & GRAY, 2006).

Um dos mais importantes determinantes para os surtos de enterovírus é a idade (PALLANSCH & ROOS, 2001). Diferentes grupos de idade apresentam diferentes tipos de suscetibilidade para a infecção, severidade da doença, manifestação clínica e prognóstico. Durante a infecção primária ocorre a maior e mais prolongada produção e liberação de partículas virais. A maioria das infecções por enterovírus ocorre durante a infância, entretanto a incidência da poliomielite é relativamente baixa em crianças de 4 a 6 meses de vida em países não industrializados em função dos anticorpos maternos presentes no leite. Nestes países, existe um aumento da incidência da doença parálitica em crianças maiores que 6 meses, provavelmente devido à exposição precoce ao vírus devido às más condições sanitárias (PALLANSCH & ROOS, 2001). Neste estudo, a média de idade dos pacientes positivos com o resultado laboratorial confirmado para PFA foi de 3,5 anos, confirmando o fato de que em países não desenvolvidos existe uma maior incidência de casos em crianças maiores que 6 meses de idade.

Apesar das infecções causadas por enterovírus serem relatadas como mais prevalentes entre o sexo masculino em função do tempo de excreção viral mais longo, do alto título viral encontrado nas fezes e de maior exposição ao vírus devido a características culturais (PALLANSCH & ROOS, 2001) foi observada uma maior frequência de amostras positivas entre o sexo feminino (53%). Durante a seleção das amostras analisadas, os únicos fatores de inclusão utilizados foram o diagnóstico inicial de PFA e os meses de recebimento das amostras (entre julho e novembro de 2007). Algumas destas amostras podiam pertencer ao mesmo

paciente, só que com datas de coleta diferentes. Este foi o caso das amostras 37402 e 37403 que pertenciam a um mesmo indivíduo do sexo feminino. Como a intenção do trabalho não era avaliar o número de pacientes atendidos, mas sim o número de amostras clínicas analisadas, este indivíduo foi contabilizado duas vezes, tornando a porcentagem do sexo feminino um pouco maior. Entretanto, quando se verificou a porcentagem de todas as amostras com suspeita de PFA, observou-se, realmente, uma maior freqüência do sexo masculino (56%).

Os estados/ país que apresentaram maior freqüência dos casos de PFA foram Minas Gerais (17%), São Paulo (11%), Peru (10%) e Bahia (8%). No entanto, os estados/país que apresentaram uma freqüência de resultados positivos foram Minas Gerais, Peru, Bahia e Goiás. Nenhum caso do estado de São Paulo foi positivo e os estados que tiveram número reduzido de casos relatados (Goiás, Alagoas, Sergipe e Ceará), apresentaram, proporcionalmente, um maior número de amostras positivas.

Métodos para a genotipagem de sorotipos de enterovírus têm sido descritos e são baseados na amplificação e seqüenciamento das regiões que codificam o gene da VP1, o qual está correlacionado com o sorotipo viral. A caracterização dos sorotipos virais usando métodos moleculares normalmente requer o uso de uma bateria de pares de *primers* em múltiplas reações de PCR e a análise da seqüência de todo gene que codifica a VP1, ou seqüências parciais (ITURRIZA-GÓMARA, MEGSON, & GRAY, 2006).

O uso de um par de *primer* degenerado amplamente reativo que amplifica parte da VP1 e o seqüenciamento nucleotídico para a caracterização do sorotipo de enterovírus tem sido descrito, e é bem aplicado na caracterização de vírus em isolados em cultura celular, reduzindo desta forma o número de reações de PCR necessárias para a determinação do sorotipo viral (OBERSTE et al, 2003a).

Os sorotipos virais identificados pelo seqüenciamento nucleotídico (*Coxsackievirus* B2, *Coxsackievirus* B3, *Poliovirus* 1, *Poliovirus* 3, *Echovirus* 6, *Echovirus* 7, *Echovirus* 11, *Echovirus* 21, *Echovirus* 29 e *Echovirus* 30) já foram associados a casos de PFA em alguns trabalhos, embora o método de sorotipagem tenha sido, na maioria das vezes, a soroneutralização (KAPOOR, AYYAGARI & DHOLE, 2001; BOLANAKI et al, 2005; KELLY et al, 2006; SAEED et al, 2007; SOJI et al, 2007).

A amostra 36873 apresentou 90% de identidade nucleotídica com um exemplar de *Coxsackievirus* B3 isolado na Rússia (SCHMIDTKE et al, 2005), a



37214, identificada como *Poliovirus* 1 apresentou 100% de identidade com uma amostra isolada entre 1978 e 1979 na Grécia (PLIAKA et al, 2007), a amostra 37222 demonstrou 81% de identidade com a cepa Farina (*Echovirus* 21) isolada nos Estados Unidos em 1950 (OBERSTE, MAHER & PALLANSCH, 2004). A amostra 37276 apresentou 85% de identidade com uma amostra de *Echovirus* 7 isolada na China (TIAN et al, 2008) assim como a amostra 37289, identificada como *Echovirus* 7, também apresentou 85% identidade nucleotídica com uma amostra isolada na Grécia (PAPAVENTSIS, SIAFAKAS & MARKOYLATOS, 2004).

A amostra 37348, identificada como *Echovirus* 30, apresentou 92% de identidade nucleotídica com uma amostra identificada na França no ano de 2000 (BAILLY et al, 2000), a 37350 (*Echovirus* 6) apresentou 95% de homologia também com uma amostra isolada na França entre os anos de 1999 e 2005 (JACQUES et al, 2008), a 37401 (*Poliovirus* 3) teve 98% de identidade com uma amostra da Suíça (METZLER & ZURBRIGGEN, 2007), as amostras 37402 e 37403 apresentaram 90% de identidade com uma amostra de *Coxsackievirus* B3 isolada nos Estados Unidos em 1987 (OBERSTE, PEÑARANDA, & PALLANSCH, 2004). A amostra 37424 apresentou 93% de identidade com um *Echovirus* 11 isolado em 2000 nos Estados Unidos (OBERSTE et al, 2003b), a 37468 teve 96% de identidade nucleotídica com um exemplar de *Coxsackievirus* B2 isolado em um surto de meningite em 2005 na França, a 37471 indicou 83% de identidade nucleotídica com uma amostra de *Echovirus* 29 isolada entre os anos de 1997 e 2004 na China (TIAN et al, 2008) e a 37508 também teve 83% de identidade com uma amostra de *Echovirus* 7 isolada no mesmo período na China (TIAN et al, 2008).

A comparação ente as taxas de isolamento do método padrão ouro do LEV e da RT-PCR das amostras de primeira passagem demonstrou não haver diferença entre as duas técnicas. O LEV utiliza duas linhagens celulares para o isolamento viral, seguida de técnicas moleculares específicas para a diferenciação dos *Poliovirus* dos NPEV, sem, entretanto, fazer a sorotipagem viral dos NPEV. Isto aumenta a taxa de isolamento (10% em todo o ano de 2007 e 9,5% entre os meses de julho a novembro de 2007). Entretanto, quando só a taxa de isolamento é calculada utilizando apenas a linhagem celular RD, observa-se uma taxa de isolamento de 7,98% para a técnica do LEV e 7,69% para a RT-PCR das amostras de primeira passagem em cultura celular.

A alta eficiência da RT-PCR das amostras de primeira passagem pode ainda ser verificada pela sensibilidade do método. Cinco das 17 amostras consideradas

positivas pela RT-PCR das amostras de primeira passagem não haviam sido detectadas pela metodologia padrão do LEV. Apesar de 2 destas amostras não terem sido sorotipadas pelo seqüenciamento nucleotídico, isto não invalida o método. Para o seqüenciamento nucleotídico funcionar perfeitamente é necessário uma quantidade mínima de DNA. Estas amostras não seqüenciadas (amostras 37242 e 37454) apresentaram, na visualização da eletroforese, a banda na altura esperada, no entanto, durante a purificação do material genético para o seqüenciamento, uma grande quantidade de DNA pode ter sido perdida. A mesma justificativa se aplica para a amostra 36918, que não apresentou efeito citopático somente na primeira passagem, no entanto foi positiva para a RT-PCR.

A eficácia da RT-PCR em amostras de primeira passagem também pode ser confirmada quando o cálculo de sensibilidade e especificidade é realizado. Quando se compara o padrão ouro utilizado pelo LEV (isolamento em culturas das duas linhagens celulares) com a RT-PCR, verifica-se uma especificidade de 80% e sensibilidade de 97%. Porém, quando os dois métodos são comparados utilizando apenas a linhagem de células RD como padrão ouro do LEV, observa-se uma especificidade de 92% e uma sensibilidade de 97%.

Apenas uma única amostra foi caracterizada pelo método padrão ouro do LEV como NPEV e não foi identificada pela RT-PCR em primeira passagem de cultura celular. Esta amostra pode ter apresentado um título muito baixo do vírus na primeira passagem, não sendo visualizada no gel durante a eletroforese, ou pode-se tratar de um vírus com o ciclo replicativo mais lento. Oberste et al (2003a), ao desenvolverem o par de *primers* 222-292, utilizados no presente trabalho, só não conseguiram amplificar uma cepa protótipo de *Enterovirus* 71 – BrCr, dos 64 sorotipos testados.

A amostra 37214 foi identificada pelo LEV como uma mistura dos três sorotipos de *Poliovirus* vacinais. Entretanto, a análise pelo seqüenciamento nucleotídico das amostras de primeira passagem em cultura celular revelou apenas o sorotipo 1. Este fato pode ser devido à composição da vacina OPV. A OPV é composta pelos 3 sorotipos de *Poliovirus*, em diferentes concentrações: *Poliovirus* 1 – 1.000.000 DICT 50 (dose infectante para 50% das culturas de células.); *Poliovirus* 2 - 100.000 DICT 50 e *Poliovirus* 3 - 600.000 DICT 50 (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001). Sendo assim, durante a excreção dos vírus vacinais pelas fezes, há uma maior liberação de partículas do sorotipo 1 que os demais. Na metodologia padrão ouro, são realizadas três reações de PCR com *primers* específicos para cada

sorotipo de *Poliovirus*. Como a metodologia do presente trabalho utilizou um par de *primer* capaz de identificar qualquer sorotipo de enterovírus, prevaleceu a amplificação do sorotipo com maior título. Durante o seqüenciamento nucleotídico, portanto, foi reconhecida somente a maior população, ou seja, o *Poliovirus*1.

O isolamento viral em cultura celular é tido como um método sensível e confiável para a detecção de enterovírus em amostras clínicas, exceto alguns sorotipos de *Coxsackievirus A*. Estes vírus não crescem bem em cultura celular e devem ser inoculados em camundongos recém-nascidos ou embriões de porquinhos da Índia. Em geral, o efeito citopático produzido pelos enterovírus em cultura celular padrão é muito característico, e pode ser reconhecido rapidamente e com precisão por técnicos especializados. A liberação rápida de um diagnóstico de infecção causada por enterovírus pode ter um impacto relevante no tratamento do paciente. Para a liberação dos resultados é necessária a observação da cultura celular na procura de efeito citopático característico, diariamente, por um período mínimo de 5 dias (para a primeira passagem celular) e máximo de 10 (para a segunda passagem celular) a partir da data de inoculação da amostra. O uso de múltiplas culturas celulares para o isolamento dos enterovírus pode aumentar a sensibilidade do diagnóstico, assim como a velocidade de isolamento viral, pois nenhuma cultura celular sozinha é capaz de isolar todos os sorotipos de enterovírus (CHONMAITREE, BALDWIN & LUCIA, 1989).

Alguns fatores, entretanto, podem afetar a sensibilidade do diagnóstico por cultura celular. A baixa sensibilidade da cultura celular pode estar associada à coleta tardia de amostras, a uma baixa concentração das partículas virais infecciosas nas fezes ou a presença de alguns sorotipos de enterovírus que são difíceis de serem isolados em cultura celular. A sensibilidade da cultura celular também pode ser afetada pela toxicidade das amostras, transporte ou estoque inapropriado que desfavorecem a infecciosidade do vírus, mas não necessariamente a detecção por RT-PCR (ITURRIZA-GÓMARA, MEGSON, & GRAY, 2006; SHOJA et al, 2007a).

Apesar de vários estudos (SANTOS et al, 2002; ITURRIZA-GÓMARA, MEGSON, & GRAY, 2006; NIX, OBERSTE & PALLANCSH, 2006; SHOJA et al, 2007a; SHOJA et al, 2007b) demonstrarem que a extração do genoma viral diretamente da amostra clínica e amplificação do seu genoma por PCR são considerados métodos mais rápidos e baratos que todo o procedimento considerado padrão ouro para o isolamento e identificação do sorotipo viral, alguns fatores devem ser observados. Apesar da extrema sensibilidade da PCR, isto pode ser considerado

um aspecto negativo do procedimento, uma vez que o problema mais comumente relatado é a liberação de resultados falso-positivos devido à contaminação cruzada. Por outro lado, a sensibilidade do método pode ser reduzida devido a uma ampla variedade de substâncias inibitórias contidas em amostras clínicas e alimentos, tais como hemoglobina, uréia, heparina, componentes orgânicos e fenólicos, glicogênio, ácidos graxos,  $\text{Ca}^{2++}$ , metais pesados e a presença de outros microorganismos, além da própria degradação do ácido nucléico em função de danos oxidativos, variações de temperatura e enzimas que degradam o RNA (WILSON, 1997). Por se tratar de uma amostra extremamente complexa, as fezes utilizadas para a pesquisa de enterovírus podem possuir um ou mais destes componentes que vão interferir na amplificação do genoma viral quando este é extraído diretamente destas amostras.

Outro fator que também pode interferir na PCR é o método de extração de ácido nucléico escolhido. Antes do início da transcrição reversa e amplificação do genoma viral, o RNA precisa ser extraído do capsídeo. Além disso, proteínas e lipídeos das amostras têm que ser removidos. Tradicionalmente, uma mistura de fenol-clorofórmio-detergente-proteinase é utilizada. Apesar de eficaz, este método não inativa todas as ribonucleases presentes nos fluidos corporais, tecidos, excretas e amostras ambientais. O isotiocianato de guanidina, sozinho ou em combinação com o fenol-clorofórmio, inativa as ribonucleases e, portanto, melhora a estabilidade do RNA extraído (ROMERO, 1999).

Segundo Wilson (1997) a diluição das amostras em meios contendo substâncias capazes de inibir os inibidores da PCR é um método simples que pode facilitar a amplificação, embora com a sensibilidade um pouco reduzida.

Portanto, a inoculação em pelo menos uma passagem celular e a extração do genoma viral diretamente desta passagem pode representar uma alternativa para a liberação mais rápida dos laudos, uma vez que o método padrão ouro preconizado pela OMS demora cerca de 21 dias para a liberação do resultado final, enquanto a RT-PCR de amostras de primeira passagem em cultura celular pode levar cerca de 10 dias. Além disso, a técnica proposta pelo presente trabalho é mais barata uma vez que envolve menos material e técnicos especializados e ainda há a atenuação de possíveis contaminações cruzadas e dos fatores que podem inibir a PCR, além da manutenção, ainda que em títulos baixos, de partículas virais incapazes de infectar a célula, mas que são detectáveis pelos métodos moleculares.

## 6. CONCLUSÕES

A RT-PCR demonstrou ser uma técnica confiável que pode diminuir o tempo de liberação do diagnóstico laboratorial de cerca de 21 dias para 10 dias, o que vai de encontro ao que a OMS preconiza.

A RT-PCR realizada em amostras de primeira passagem de cultura celular mostrou uma alta especificidade (80%) e uma alta sensibilidade (97%) quando comparadas com o método padrão ouro realizado pelo LEV, indicando que a técnica pode ser considerada confiável.

A comparação feita entre as taxas de isolamento e da RT-PCR em amostras de primeira passagem mostrou não haver diferença quando se utiliza apenas uma cultura celular. Entretanto, quando as taxas de isolamento entre o padrão ouro e a RT-PCR realizada na primeira passagem de células da linhagem RD são comparadas, observa-se uma pequena diferença. Este fato demonstra a importância de mais de um tipo de linhagem celular como garantia no diagnóstico.

A tipagem molecular, baseada no seqüenciamento parcial do gene VP1, mostrou ser de grande utilidade na identificação dos sorotipos de enterovírus.

A baixa concentração de material genético pode ter sido a causa da não determinação do sorotipo de 3 das 17 amostras positivas para enterovírus pela RT-PCR.

O preenchimento adequado das fichas epidemiológicas dos pacientes com suspeita de PFA demonstrou ser imprescindível para obter informações epidemiológicas pertinentes a esta doença. Esses dados podem também subsidiar a atuação dos órgãos de Vigilância Sanitária a fim de permitir a melhoria dos serviços prestados pelos hospitais garantindo o direito à saúde.

## 7. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Plano Diretor de Vigilância Sanitária**. Brasília. dez. 2006. 27p. Disponível em: <[http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq\\_907\\_PDVISA-181206.pdf](http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq_907_PDVISA-181206.pdf)>. Acesso em: 3 fev. 2008.

ALVANHAN, R. A. M., et al. **Vigilância Epidemiológica**. p. 211 – 230, 2000. Disponível em: <<http://www.ccs.uel.br/nesco/regesus/arquivos/Cap%C3%ADtulo%2011.pdf>>. Acesso em 17 dez. 2007.

BAILLY, J. L. et al. Genetic diversity of echovirus 30 during a meningitis outbreak, demonstrated by direct molecular typing from cerebrospinal fluid. **Journal of Medical Virology**. v. 68, n. 4, p. 558 – 567, 2000.

BOLANAKI, E., et al. A comparative amplification of five different genomic regions on Coxsackie A and B viruses. Implications in clinical diagnostics. **Molecular and Cellular Probes**. v. 19, p. 127-135, 2005.

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

BRASIL. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Fundação Nacional de Saúde. Vols. 1 e 2. Brasília, 2002. 842p.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, set. 1990. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br/ccivil/leis/L8080.htm>>. Acesso em 12 dez. 2007.

BRASIL. Portaria nº 1.943, de 18 de outubro de 2001. Define a relação de doenças de notificação compulsória para todo o território nacional. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, out. 2001. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=5954>>. Acesso em 13 out. 2007.

BRICKS, L. F. Poliomielite: Situação epidemiológica e dificuldades para a erradicação global. **Pediatria**. v. 19, n. 1, p. 24-37, 1997. Disponível em: <<http://www.pediatrasiapaulo.usp.br/upload/html/254/body/04.htm>>. Acesso em 12 dez. 2007.

CHONMAITREE, T; BALDWIN, C. D.; LUCIA, H. L. Role of the virology laboratory in diagnosis and management of patients with central nervous system disease. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 2, n. 1, p. 1-14, 1989.

COSTA, E. A; ROZENFELD, S. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. IN: ROZENFELD, S. **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ. 2004. p. 15-40.

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

FENNER, F. J.; WHITE, D. O. Picornaviridae. In: FENNER, F. J.; WHITE, D. O. **Medical Virology**. 2 ed. New York: Academic Press INC, 1975. p. 332-354.

GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2008a. Disponível em: <<http://www.polioeradication.org/>>. Acesso em: 17 fev. 2008.

GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE. **Wild Poliovirus Weekly Update**. 2008b. Disponível em: <<http://www.polioeradication.org/content/general/MonthlyGlobalupdate.pdf>>. Acesso em 23 abr. 2008.

GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE. **Wild Poliovirus Weekly Update**. 2008c. Disponível em: <<http://www.polioeradication.org/content/general/casemap.shtml>>. Acesso em 23 abr. 2008.

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

INTERNATIONAL COMMITTEE OF TAXONOMY OF VIRUSES. **ICTVDB Index of Viruses**, New York, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm>>. Acesso em: 15 fev. 2008.

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

JACQUES, et al. Epidemiological, molecular, and clinical features of enterovirus respiratory infections. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, p. 206 – 213, 2008.

KAPOOR, A.; AYYAGARI, A.; DHOLE, T. N. Non-polio enteroviruses in acute flaccid paralysis. **Indian Journal of Pediatrics**. v. 68, p. 927-929, 2001.

KELLY, H., et al. Polioviruses and other enteroviruses isolated from faecal samples of patients with acute flaccid paralysis in Australia, 1996-2004. **Journal of Paediatrics and Child Health**. v. 42, p. 370-376, 2006.

KEW, O. et al. The role of virologic surveillance in the global initiative to eradicate poliomyelitis. IN: KURSTAK E. **Control of Virus diseases**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 215-246.

KILPATRICK, D. R; et al. Group-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-based deoxyinosine residues at positions of codon degeneracy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 12, p. 2990-2996, 1996.

LAMARÃO, L. M.; GOMES, M. L. C. Enterovírus não pólio na região norte do Brasil. **Revista Paraense de Medicina**. v. 16, n. 2, 7-12, 2002.

MARK, H.; SAWYER, M. D. Enterovirus Infections: diagnosis and treatment. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**. v. 13, n. 1, p. 40-47, 2002.

MEDRONHO, R. A., PEREZ, M. A. Testes Diagnósticos. In: MEDRONHO, R. A., et al. **Epidemiologia**. São Paulo, Atheneu, 2006. p. 259-270.



MELNICK, J. L. The discovery of the enteroviruses and the classification of polioviruses among them. **Biologicals**. v. 21, p. 305-309, 1993.

METZLER, A.; ZURBRIGGEN, S. **Environmental Surveillance in Switzerland**, Zurich, mar. 2007. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list\\_uids=145208554&dopt=GenBank&WebEnv=0ei17dP9qMeP2w-\\_uol2v-6\\_5-%40264E55967CC43210\\_0146SID&WebEnvRq=1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list_uids=145208554&dopt=GenBank&WebEnv=0ei17dP9qMeP2w-_uol2v-6_5-%40264E55967CC43210_0146SID&WebEnvRq=1)>. Acesso em: 27 jan. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Campanha nacional de vacinação contra a poliomielite**. Brasília, 2007. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/polio\\_1\\_etapa\\_2007.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/polio_1_etapa_2007.pdf)>. Acesso em: 14 fev. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Campanha nacional de vacinação contra a poliomielite**. Brasília 2006. Disponível em: <<http://www.senaaires.com.br/eventos/evento6/pdf/basico/03.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2008.

NIX, W. A.; OBERSTE, M. S.; PALLANSCH, M. A. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 8, p. 2698-2704, 2006.

OBERSTE M. S., et al. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with PV1 sequence and application to picornavirus classification. **Journal of Virology**. v. 73, n. 3, p. 1941-1948, 1999a.

OBERSTE M. S., et al. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, n. 5, p. 1288-93, 1999b.

OBERSTE, M. S, et al. Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. **Journal of General Virology**. v. 87, p. 119-128, 2006.

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

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

OBERSTE, M. S., et al. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing, **Journal of Clinical Virology**. v. 26, p. 375–377, 2003a.

OBERSTE, M. S., et al. Molecular epidemiology and type-specific detection of echovirus 11 isolates from the Americas, Europe, Africa, Australia, southern Asia and the Middle East. **Virus Research**, v. 91, n. 2, p. 241-248, 2003b.

OBERSTE, M. S., et al. Molecular identification of 13 new enterovirus types, EV79-88, EV97 e EV100-101, members of the species *Human Enterovirus B*. **Virus Research**. v. 128, n. 1-2, p. 34-42, 2007.

OBERSTE, M. S.; MAHER, K.; PALLANSCH, M. A. Evidence for Frequent Recombination within Species *Human Enterovirus B* Based on Complete Genomic Sequences of All Thirty-Seven Serotypes. **Journal of Virology**. v. 78, n.2, p. 855-867, 2004.

OBERSTE, M. S.; PEÑARANDA, S.; PALLANSCH, M. A. RNA Recombination plays a major role in genomic change during circulation of Coxsackie B Viruses. **Journal of Virology**. v. 78, n. 6, p. 2948–2955, 2004.

PALACIOS, G.; OBERSTE, M.S. Enterovirus as agents of emerging infectious diseases. **Journal of Neurovirology**. v. 11, p. 424-433, 2005.

PALLANSCH, M. A.; ROOS, R. P. Enteroviruses: Poliovirus, Coxsackievirus, Echovirus and newer Enterovirus. IN: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. **Fields Virology**, 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 723 – 777.

PALMEIRA, G. Epidemiologia. IN: ROZENFELD, S. **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ. 2004. p. 135-194.

PAPAVENTSIS, D. C.; SIAFAKAS, N.; MARKOYLATOS, P. **Concentration, detection and identification of enteroviruses in sewage**, Athenas, maio, 2004. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list\\_uids=49089510&dopt=GenBank&WebEnv=0zirdKOv\\_c9IWe35EkFiCptK5x%4026425CA17EBDA400\\_0053SID&WebEnvRq=1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list_uids=49089510&dopt=GenBank&WebEnv=0zirdKOv_c9IWe35EkFiCptK5x%4026425CA17EBDA400_0053SID&WebEnvRq=1)>. Acesso em: 13 jan. 2008.

PLIAKA, V., et al. Use of mutational pattern in 50-NCR and VP1 regions of polioviruses for molecular diagnosis. **Molecular and Cellular Probes**. v. 21, p. 267–275, 2007.

PROENÇA, L. G. Campanha Nacional de Vacinação Contra a Poliomielite. **Informe técnico governo do estado de Santa Catarina**, 2005. Disponível em: <<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/imunizacao/vacina/InformeTecnicoSCCampoliofinal.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

RACANIELLO, V. R. Picornaviridae: The viruses and their replication. IN: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. **Fields Virology**, 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 685-723.

RACANIELLO, V. R. One hundred years of poliovirus pathogenesis. **Virology**. v. 344, p. 9-16, 2006.

ROMERO, J.R. Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction detection of the enteroviruses. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**. v. 123, p. 1161-1169, 1999.

SAEED, M., et al. Epidemiology and clinical findings associated with enteroviral acute flaccid paralysis in Pakistan. **BMC Infectious Diseases**. v. 7, n. 6, p. 1-6, 2007.

SANTOS, A. P., et al. Rt-PCR based analysis of cell culture negative stools samples from poliomyelitis suspected cases. **Journal of Clinical Virology**. v. 23, p. 149-152, 2002.

SAWYER, M.H. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. **Seminars in Pediatric Infectious Disease**. v.13, n. 1, p. 40-47, 2002.

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

SCHMIDTKE, M., et al. Susceptibility of coxsackievirus B3 laboratory strains and clinical isolates to the capsid function inhibitor pleconaril: antiviral studies with virus chimeras demonstrate the crucial role of amino acid 1092 in treatment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 56, n. 4, p. 648-656, 2005.

SHOJA, Z. O; et al. Detection of enteroviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in cell culture negative stool specimens of patients with acute flaccid paralysis. **Journal of Virological Methods**. v. 142, p. 95-97, 2007a.

SHOJA, Z. O; et al. Comparison of cell culture with RT-PCR for *Enterovirus* detection in stool specimens from patients with acute flaccid paralysis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. v. 21, p. 232-236, 2007b.

SOJI, O. B., et al. Non-polio enteroviruses implicate in acute flaccid paralysis in Northern Nigeria. **Research Journal of Medicine and Medical Sciences**. v. 2, n. 1, p. 25-28, 2007.

TEIXEIRA, C. F.; PAIM, J. S.; VILLASBÔAS, A. L. SUS, modelos assistenciais e vigilância da saúde. IN: ROZENFELD, S. **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2004. p. 49-60.

TEIXEIRA-ROCHA, E. S.; TAVARES-NETO, J. Indicadores de efetividade da vigilância epidemiológica para paralisias flácidas agudas no Brasil de 1990 a 2000. **Revista Panamericana de Saúde Pública**. v. 14, n. 15, p. 325-333, 2003.

TIAN, B., et al. Molecular typing and epidemiology of non-polio enteroviruses isolated from Yunnan Province, the People's Republic of China. **Journal of Medical Virology**. v. 80, n. 4, p. 670 – 679, 2008.

VERANI, J. F. S.; MARANHÃO, E. P.; LAENDER, F. Desenvolvimento dos sistemas de vigilância epidemiológica da varíola e da poliomielite: A transformação de Conceitos em Categorias Operacionais. **Caderno de Saúde Pública**. v. 9, n. 1, p. 28-38, 1993.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 63, n.10, p. 3741-3751, 1997.

WIKIPEDIA. **Poliomyelitis**. 27 mar. 2008. Disponível em: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Polio#cite\\_note-Paul\\_1971-4](http://en.wikipedia.org/wiki/Polio#cite_note-Paul_1971-4)>. Acesso em: 28 jan. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Polio Laboratory Manual**, Genebra. 2004. 157p. Disponível em: <<http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/WHO-Polio-Manual-9.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION . **Polio Case Count**, Genebra, 2008. Disponível em: <[http://www.who.int/vaccines/immunization\\_monitoring/en/diseases/poliomyelitis/case\\_count.cfm](http://www.who.int/vaccines/immunization_monitoring/en/diseases/poliomyelitis/case_count.cfm)>. Acesso em: 23 abr. 2008.