

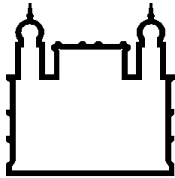
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

**Caracterização genética dos vírus do sarampo genótipo D4
detectados no Brasil no período de 2003-2012**

SÁDIA ABDUL REMANE AMADE ALI

Rio de Janeiro

2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTORA: Sádía Abdul Remane Amade Ali

**Caracterização genética dos vírus do sarampo genótipo
D4 detectados no Brasil no período de 2003-2012**

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

ORIENTADORA: Prof. Dr^a. Marilda Mendonça Agudo de Teixeira Siqueira

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Ilesh V. Jani

Rio de Janeiro

2012

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

A398 Ali, Sália Abdul Remane Amade

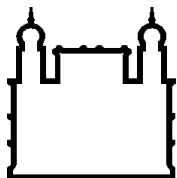
Caracterização genética dos vírus do sarampo genótipo D4 detectados no Brasil no período de 2003-2012 / Sália Abdul Remane Amade Ali. – Rio de Janeiro, 2012.
xviii, 133 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2012.

Bibliografia: f. 107-133

1. Vírus do sarampo. 2. Genótipo D4. 3. Proteína N. 4. Hemaglutinina. I. Título.

CDD 616.01



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTORA: Sádía Abdul Remane Amade Ali

**Caracterização genética dos vírus do sarampo genótipo
D4 detectados no Brasil no período de 2003-2012**

ORIENTADORA: Prof. Dr^a. Marilda Mendonça Agudo de Teixeira Siqueira

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Ilesh V. Jani

Aprovada em: _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr^a. Ana Maria Bispo de Filippis - PRESIDENTE

Prof. Dr^a Rita De Cassia Nasser Cubel Garcia

Prof. Dr^a. Monick Lindenmeyer Guimarães

Prof. Dr^a. Maria de Lourdes Aguiar Oliveira

Prof. Dr. Fernando Couto Motta

Rio de Janeiro, 19 de Dezembro de 2012

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Madania Amade e Abdul Ali, pelos exemplos de força, superação e dedicação, bases da minha educação, que sempre cuidaram do meu crescimento pessoal e profissional com muita atenção e carinho;

Aos meus irmãos Kátia e Dércio, por lembrarem-me através dos seus ensinamentos que a conquista é fruto do nosso árduo esforço, e o desafio é fazer o que for necessário para conquistar a felicidade.

"Depois de termos conseguido subir a uma grande montanha, só descobrimos que existem ainda outras grandes montanhas por subir.

E tudo parece impossível até que seja feito."

(Nelson Mandela)

AGRADECIMENTOS

A Dra. Marilda Siqueira, minha orientadora, pelas inúmeras oportunidades de aprendizado e desenvolvimento concedidas, pela confiança, compreensão e por ter me guiado com muita sabedoria e empenho durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Ilesh Jani, meu co-orientador, por ter despertado em mim a curiosidade científica, por acreditar em mim, além de ter proporcionado um inestimável crescimento técnico e científico, em particular de realizar este mestrado.

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

Ao Dr. Fernando Motta e a Xênia Lemos, pela disponibilidade em auxiliar-me, apoiar e esclarecer minhas dúvidas inesgotáveis, e suas valiosas contribuições durante a realização deste trabalho.

A Dra. Ana Bispo, pelo carinho, compreensão e pelas valiosas sugestões e correções fundamentais na elaboração deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo (LVRS), pelo enorme carinho com qual fui acolhida nesse laboratório, pela amizade, apoio, estímulo, agradável convívio diário e pelos vários ensinamentos.

A toda equipa do setor de isolamento viral do Instituto Nacional de Saúde de Moçambique, e aos colegas da Pós-graduação em Medicina Tropical pelo apoio e companheirismo.

A Coordenação do curso de Pós-Graduação em Medicina tropical, em especial a Dra Alda Maria da Cruz e Dr. Filipe Aníbal, pela oportunidade de aprendizado com a realização do presente Mestrado. E a todo corpo docente, pelos ensinamentos transmitidos durante o curso.

Aos funcionários da Secretaria Acadêmica, sempre prestativos, pelo pronto atendimento em várias ocasiões e pelo carinho o qual sempre fui recepcionada.

A toda minha família especialmente aos meus pais Madania e Abdul Ali, e meus irmãos Kátia e Dércio, pelo carinho, compreensão, apoio contínuo, por serem os pilares da minha vida, meu porto seguro.

Ao Ministério da Saúde de Moçambique (MISAU), Instituto Nacional de Saúde (INS), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Ministério da Ciência e Tecnologia de Moçambique (MCT), pelo apoio financeiro concedido para a realização deste mestrado.

A todos aqueles que direta ou indiretamente, de alguma forma, mostraram-se presentes na elaboração deste trabalho, viabilizando e alegrando todo o caminho percorrido até que fosse possível a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. HISTÓRICO: A DOENÇA	1
1.2. VÍRUS DO SARAMPO	2
1.2.1. Morfologia, características físico-químicas e genoma viral.....	3
1.2.2. Proteína N.....	4
1.2.3. Proteína P.....	6
1.2.4. Proteína M	7
1.2.5. Proteína F.....	7
1.2.6. Proteína H.....	7
1.2.7. Proteína L	9
1.3. CARACTERÍSTICAS ANTIGÊNICAS	10
1.4. RECEPTORES VIRAIS.....	11
1.5. REPLICAÇÃO VIRAL.....	13
1.6. PATOGÊNESE DO SARAMPO	15
1.7. RESPOSTA IMUNE.....	17
1.8. A IMUNOSSUPRESSÃO INDUZIDA PELO VÍRUS DO SARAMPO	20
1.9. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	22
1.10. DIAGNÓSTICO	26

1.10.1. Testes sorológicos	27
1.10.2. Isolamento viral e detecção do RNA viral.....	28
1.11. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	30
1.11.1. Distribuição Mundial do sarampo	32
1.11.2. Distribuição dos genótipos do vírus do sarampo no Mundo	34
1.11.3. Sarampo na Região das Américas	38
1.11.4. Sarampo no Brasil	42
1.12. PREVENÇÃO E TERAPÊUTICA	46
1.12.1. Vacina.....	46
1.12.2. Tratamento.....	49
2. JUSTIFICATIVA	51
3. OBJETIVOS.....	53
3.1. OBJETIVO GERAL	53
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
4. METODOLOGIA E ESTRATÉGIAS.....	54
4.1. CASUÍSTICA	54
4.2. ETAPAS DO ESTUDO	56
4.3. ISOLAMENTO VIRAL EM CULTURAS CELULARES	57
4.3.1. Meios utilizados para o isolamento Viral em cultura de células Vero/SLAM	57
4.4. EXTRAÇÃO DO RNA	58
4.5. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR) APLICADA AO GENE N.....	59
4.6. AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO GÊNICO H PARA SEQUENCIAMENTO	61
4.6.1. Síntese de cDNA	61

4.6.2. Padronização da reação de síntese de cDNA.....	62
4.6.3. Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)	63
4.7. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA REAÇÃO DE RT-PCR	65
4.8. QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	66
4.9. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO PARA O GENE H COMPLETO	66
4.10. PURIFICAÇÃO DO DNA	66
4.11. SEQUENCIAMENTO DOS NUCLEOTÍDEOS E ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS ...	67
4.12. ANÁLISE FILOGENÉTICA	67
4.13. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	69
5. RESULTADOS	70
5.1. ISOLAMENTO DO VÍRUS DO SARAMPO EM CULTURAS CELULARES VERO/SLAM	70
5.2. ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE N PARCIAL (450 NUCLEOTÍDEOS).....	71
5.3. ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA SEQUÊNCIA DO GENE N PARCIAL	74
5.4. PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE RT-PCR PARA O GENE H COMPLETO.....	82
5.5. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DA HEMAGLUTININA (GENE H COMPLETO).....	85
5.6. ANÁLISE DA VARIABILIDADE NA SEQUÊNCIA COMPLETA DO GENE H.....	87
6. DISCUSSÃO.....	97
6.1. ISOLAMENTO DO VÍRUS DO SARAMPO EM CULTURAS CELULARES VERO/SLAM	98
6.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA REGIÃO C-TERMINAL DA PROTEÍNA N.....	99
6.3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA PROTEÍNA H COMPLETA	102
7. CONCLUSÃO.....	105
8. PRESPECTIVAS	106
9. BIBIOGRAFIA	107

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1-1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VÍRUS DO SARAMPO.	4
FIGURA 1- 2: ORGANIZAÇÃO DA PROTEÍNA N.	6
FIGURA 1- 3: ESTRUTURA PRIMÁRIA DA PROTEÍNA H.	8
FIGURA 1- 4: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO DE REPLICAÇÃO DO VÍRUS DO SARAMPO.	15
FIGURA 1- 5: PRINCIPAL MODO D TRANSMISSÃO DO VÍRUS DO SARAMPO NO CORPO INFECTADO.	16
FIGURA 1- 6: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO ILUSTRANDO UMA VISÃO GERAL DA PATOGÊNESE DO SARAMPO DESDE O MOMENTO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ATE A RECUPERAÇÃO. 20	
FIGURA 1- 7: DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE SARAMPO POR MÊS E POR REGIÕES DA OMS, 2008-2012.	32
FIGURA 1- 8: DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO SARAMPO EM 2011.	35
FIGURA 1- 9: DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE SARAMPO E ESTRATÉGIAS IMPLEMENTADAS PARA O CONTROLE E ELIMINAÇÃO DO SARAMPO NAS AMÉRICAS, NO PERÍODO DE 1980-2009.	41
FIGURA 1- 10: GENÓTIPOS DE SARAMPO IDENTIFICADOS A PARTIR DE INVESTIGAÇÕES DE CASOS NAS AMÉRICAS, 2001-2009.	42
FIGURA 1- 11: ESTRATÉGIAS DE CONTROLE E INCIDÊNCIA DO SARAMPO 1968-2011, BRASIL.	45
FIGURA 1- 12: DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS CONFIRMADOS DE SARAMPO POR ESTADO EM 2011 NO BRASIL.	46
FIGURA 4- 1: FLUXOGRAMA DAS ETAPAS E TÉCNICAS UTILIZADAS PARA A REALIZAÇÃO DO PRESENTE ESTUDO.	56
FIGURA 4- 2: ILUSTRAÇÃO DA ESTRATÉGIA UTILIZADA PARA A AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DA GENE H COMPLETO.	63
FIGURA 5-1: ILUSTRA O EFEITO CITOPÁTICO (CPE) EM CÉLULAS VERO/hSLAM CAUSADO PELO VÍRUS DO SARAMPO.	71
FIGURA 5-2: GEL DE AGAROSE A 2% APÓS ELETROFORESE APRESENTANDO OS PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA PROTEÍNA N, OBTIDOS NA REAÇÃO DE RT-PCR.	71
FIGURA 5-3: FLUXOGRAMA DE SELEÇÃO DAS AMOSTRAS PARA O ENSAIO REALIZADO. ...	70

FIGURA 5-4: RELAÇÃO FILOGENÉTICA DAS AMOSTRAS DO VÍRUS DO SARAMPO (REGIÃO C- TERMINAL DA PROTEÍNA N) DO GENÓTIPO D4 CIRCULANTES NO BRASIL EM 2003, 2006, 2010, 2011 E 2012 E AS CEPAS REFERÊNCIA DOS PRINCIPAIS GENÓTIPOS.	73
FIGURA 5-5: RELAÇÃO FILOGENÉTICA DAS AMOSTRAS DO VÍRUS DO SARAMPO (REGIÃO TERMINAL DOS 450 NUCLEOTÍDEOS VARIÁVEIS DO GENE N) DO GENÓTIPO D4 CIRCULANTES NO BRASIL EM 2003, 2006, 2010, 2011 E 2012 E AS CEPAS CIRCULANTES NO MUNDO.	75
FIGURA 5- 6: GEL DE AGAROSE A 2% APÓS ELETROFORESE, APRESENTANDO OS PRODUTOS OBTIDOS NA REAÇÃO DE RT-PCR NO PROTOCOLO ESTABELECIDO COM O USO DE INICIADORES REVERSOS ESPECÍFICOS NA REAÇÃO DE CDNA.	83
FIGURA 5-7: GEL DE AGAROSE A 2% APÓS ELETROFORESE, APRESENTADO OS PRODUTOS OBTIDOS NA REAÇÃO DE RT-PCR DOS FRAGMENTOS GÊNICOS DO GENE H COMPLETO, EM TRÊS CONDIÇÕES DIFERENTES.	84
FIGURA 5- 8: RELAÇÃO FILOGENÉTICA DAS AMOSTRAS DO VÍRUS DO SARAMPO (GENE H COMPLETO) DO GENÓTIPO D4 CIRCULANTES NO BRASIL EM 2003, 2006, 2010, 2011 E 2012 E AS CEPAS REFERÊNCIA DOS PRINCIPAIS GENÓTIPOS.	86
FIGURA 5-9: RELAÇÃO FILOGENÉTICA DAS AMOSTRAS DO VÍRUS DO SARAMPO (GENE H COMPLETO) DO GENÓTIPO D4 CIRCULANTES NO BRASIL EM 2003, 2006, 2010, 2011 E 2012 E AS CEPAS CIRCULANTES NO MUNDO.	89

ÍNDICE DE TABELAS

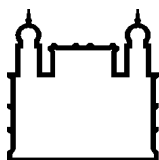
TABELA 4- 1: DISTRIBUIÇÃO DAS 39 AMOSTRAS POSITIVAS PARA O VÍRUS DO SARAMPO, CARACTERIZADAS COMO GENÓTIPO D4 PELA ANÁLISE DO GENE N INCLUÍDAS NO ESTUDO, SEGUNDO O ANO E A UNIDADE FEDERADA.	55
TABELA 4- 2: REAGENTES DA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA	60
TABELA 4- 3: SEQUÊNCIAS DOS INICIADORES UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DO GENE N	60
TABELA 4- 4: REAGENTES UTILIZADOS PARA PCR APLICADA AO GENE N	61
TABELA 4- 5: INFORMAÇÕES GERAIS DOS INICIADORES PARA O GENE H	64
TABELA 4- 6: NÚMERO DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS DOS GENES N PARCIAL E H COMPLETO* DO VÍRUS DO SARAMPO DEPOSITADAS NO GENBANK.....	68
TABELA 5- 1: ALINHAMENTO DE AMINOÁCIDOS DAS 39 SEQUÊNCIAS DO GENE N (REGIÃO C-TERMINAL DA PROTEÍNA N) DO VÍRUS DO SARAMPO, COM A CEPA VACINAL SCHWARZ E A CEPA MONTREAL REFERÊNCIA PARA O GENÓTIPO D4.	76
TABELA 5- 2: SUBSTITUIÇÕES NOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS (REGIÃO C-TERMINAL DA PROTEÍNA N) NAS SEQUÊNCIAS ANALISADAS DO VÍRUS DO SARAMPO DO GENÓTIPO D4 CIRCULANTE DURANTE OS ANOS DE 2003, 2006, 2010, 2011 E 2012, EM RELAÇÃO A SEQUÊNCIA VACINAL SCHWARZ	78
TABELA 5-3: SUBSTITUIÇÕES NOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS NAS SEQUÊNCIAS (PROTEÍNA N) ANALISADAS DO VÍRUS DO SARAMPO DO GENÓTIPO D4 CIRCULANTE DURANTE OS ANOS DE 2003, 2006, 2010, 2011 E 2012, EM RELAÇÃO A SEQUÊNCIA REFERÊNCIA PARA O GENÓTIPO D4 (MVI/MONTREAL.CAN/89)	79
TABELA 5-4: MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NAS AMOSTRAS BRASILEIRAS DO GENÓTIPO D4 (REGIÃO C-TERMINAL DA PROTEÍNA N) DO ANO DE 2003 EM RELAÇÃO A AMOSTRAS DA EUROPA DO MESMO ANO.	80
TABELA 5-5: MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NAS AMOSTRAS BRASILEIRAS DO GENÓTIPO D4 (REGIÃO C-TERMINAL DA PROTEÍNA N) DO ANO DE 2006 EM RELAÇÃO A AMOSTRAS DA EUROPA E ÍNDIA.....	80
TABELA 5-6: MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NAS AMOSTRAS BRASILEIRAS DO GENÓTIPO D4 (REGIÃO C-TERMINAL DA PROTEÍNA N) DO ANO DE 2010 EM RELAÇÃO A AMOSTRAS DA EUROPA E AMÉRICA.....	81
TABELA 5-7: MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NAS AMOSTRAS BRASILEIRAS DO GENÓTIPO D4 (REGIÃO C-TERMINAL DA PROTEÍNA N) DO ANO DE 2011 EM RELAÇÃO A AMOSTRAS DA EUROPA.....	81

TABELA 5-8: MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NAS AMOSTRAS BRASILEIRAS DO GENÓTIPO D4 (REGIÃO C-TERMINAL DA PROTEÍNA N) DO ANO DE 2012 EM RELAÇÃO A AMOSTRAS DA EUROPA E DOS ESTADOS UNIDOS.....	82
TABELA 5-9: ESPÉCIMES QUE OBTIVERAM RESULTADO POSITIVO NA DETECÇÃO DO RNA VIRAL PELA AMPLIFICAÇÃO DO GENE H COMPLETO E POSTERIOR SEQUENCIAMENTO	84
TABELA 5-10: ALINHAMENTO DE AMINOÁCIDOS DAS 14 SEQUÊNCIAS DO GENE H COMPLETO DO VÍRUS DO SARAMPO, COM A CEPA VACINAL SCHWARZ E A CEPA MONTREAL REFERÊNCIA PARA O GENÓTIPO D4.....	90
TABELA 5-11: MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NAS AMOSTRAS BRASILEIRAS DO GENÓTIPO D4 (PROTEÍNA H) DOS ANOS DE 2006 EM RELAÇÃO A AMOSTRAS DA EUROPA E ASIA...	93
TABELA 5-12: MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NAS AMOSTRAS BRASILEIRAS DO GENÓTIPO D4 (PROTEÍNA H) DOS ANOS DE 2006 EM RELAÇÃO A AMOSTRAS DA EUROPA E ASIA...	93
TABELA 5-13 MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NAS AMOSTRAS BRASILEIRAS DO GENÓTIPO D4 (PROTEÍNA H) DOS ANOS DE 2010, 2011 E 2012 EM RELAÇÃO A AMOSTRAS DA EUROPA.....	93
TABELA 5-14: SUBSTITUIÇÕES NOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS (PROTEÍNA H) NAS SEQUÊNCIAS ANALISADAS DO VÍRUS DO SARAMPO DO GENÓTIPO D4 CIRCULANTE DURANTE OS ANOS DE 2003, 2006, 2010, 2011 E 2012, EM RELAÇÃO A SEQUÊNCIA REFERÊNCIA PARA O GENÓTIPO D4 (MVI/MONTREAL.CAN/89)	94
TABELA 5-15:SUBSTITUIÇÕES EM RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS (NA PROTEÍNA H COMPLETA) PARTIR DA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO VÍRUS DO SARAMPO GENÓTIPO D4 DETECTADO NO PERÍODO DE 2003 À 2012, QUANDO COMPARADAS COM A CEPA VACINAL SCHWARZ, DANDO EVIDÊNCIA AS REGIÕES COM IMPORTÂNCIA PARA AS FUNÇÕES BIOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS	95
TABELA 5-16: SUBSTITUIÇÕES NOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS (PROTEÍNA H) NAS SEQUÊNCIAS ANALISADAS DO VÍRUS DO SARAMPO DO GENÓTIPO D4 CIRCULANTE DURANTE OS ANOS DE 2003, 2006, 2010, 2011 E 2012, EM RELAÇÃO A SEQUÊNCIA VACINAL SCHWARZ	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	Aminoácidos
BA	Bahia
CD46	<i>Membrana cofactor protein-MCP</i>
CDC	Centro para controle de Doenças e Prevenção (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>), Estados Unidos da América
cDNA	DNA complementar
CPE	Efeito citopático
DC	Célula dendrítica (<i>Dendritic Cell</i>)
DC-SIGN	Não interina capturadora de ICAM3 específica das células dendríticas (<i>Dendritic Cell Specific ICAM3 Gragging Non-integrin</i>)
DMEN	Meio de Eagle modificado por Dulbecco/ <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
FCS	Soro fetal bovino
HIV	Vírus da imunodeficiência humana/ <i>Human Immunodeficiency virus</i>
HI	Inibição da Hemaglutinina
IFN	Interferon
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LACENS	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LVRS	Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo
M	Proteína de Matriz
MCP	Proteína cofatora de Membrana (<i>membrane Cofactor Protein</i>)
MG	Minas Gerais
MIBE	<i>Mealses inclusion body encephalitis</i>
MMLV	<i>Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase</i>
MMR	<i>Measles Mumps Rubella</i> , vacina tríplice viral Sarampo, Caxumba, Rubéola
mRNA	RNA mensageiro

MS	Ministério da Saúde
NCR	Região Não Codificante (<i>Non-Coding Region</i>)
Nm	Nanômetros
NK	Natural Killer
OMS/WHO	Organização Mundial Da Saúde/ <i>World Health Organization</i>
ORF	Fase aberta de leitura
PAHO	Organização Pan-Americana de Saúde
Pb	Pares de base
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
Rpm	Rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
RT	Transcrição reversa
SC	Santa Catarina
SNF	Secreção de nasofaringe
SLAM	<i>(Signalling lymphocytic activating molecule)</i>
SSPE	Panencefalite esclerosante Subaguda
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis fator</i>)
UNICEF	United Nations Children's Fund
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrometros
UV	Ultravioleta
Vero/SLAM	Célula Vero transfectada para expressar a molécula SLAM humana



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Caracterização genética dos vírus do sarampo genótipo D4 detectados no Brasil no período de 2003-2012

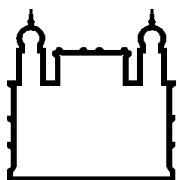
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sádia Abdul Remane Amade Ali

O sarampo é uma doença exantemática viral, altamente infecciosa, causada por um vírus da família *Paramyxoviridae*, gênero *Morbillivirus* que, apesar de estar disponível uma vacina, segura e eficaz contra a doença, esta ainda constitui uma importante causa de morbidade e mortalidade infantil em muitos países em desenvolvimento. Embora exista apenas um tipo antigênico do vírus do sarampo, estudos de caracterização genética dos vírus de tipo selvagem permitiram a identificação oito subtipos (A-H) e 24 genótipos. O Brasil eliminou a transmissão autóctone do vírus do sarampo a partir do ano 2000. A partir de então foram confirmados vários casos de sarampo importados ou relacionados a importações, principalmente do genótipo D4. A epidemiologia molecular dos vírus do sarampo baseada nas análises da região C-terminal da nucleoproteína tem demonstrado uma diversidade limitada entre as cepas circulantes, dificultando dessa forma a determinação da origem dos vírus usando apenas essa região. O objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente os genótipos D4 dos vírus do sarampo detectados no Brasil no período de 2003 a 2012, e para tal, as sequências da proteína H completa e do gene N parcial foram analisadas. Os casos positivos para o genótipo D4 foram previamente identificados pela amplificação dos 450nt da região C-terminal da proteína N por RT-PCR, as sequências completas do gene H destas amostras foram diretamente amplificadas por RT-PCR a partir das amostras clínicas e posteriormente sequenciado. As análises filogenéticas da sequência de nucleotídeos do gene N e do gene H completo mostraram que os vírus do sarampo genótipo D4 detectados no Brasil podem ser resultado de várias importações de diferentes variantes do mesmo genótipo que circulam na Europa. Foram identificadas mutações nas sequências de aminoácidos tanto do gene N parcial como do gene H completo dos genótipos D4 dos vírus do sarampo detectados no Brasil. Estas mutações parecem não alterar as propriedades antigênicas e imunológicas do vírus.

Palavras-chave: vírus do sarampo; genótipo D4; Proteína N; Hemaglutinina



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Genetic Characterisation of Measles virus genotype D4 detected in Brazil, 2003-2012

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sádia Abdul Remane Amade Ali

Measles is a highly infectious viral exanthem of the family *Paramyxoviridae*, genus *Morbillivirus*. Despite the availability of a safe and effective vaccine, measles infection continues to be an important cause of infantile morbidity and mortality in developing countries. Although there is only one antigenic type of the measles virus, genetic characterisation of the wild-type virus identified 8 subtypes (A-H), with a total of 24 genotypes being recognised. From 2000, the indigenous transmission of the measles virus has been eliminated in Brazil. Since then, several cases of imported measles, or cases associated with importations, were confirmed, principally of genotype D4. The molecular epidemiology of the measles virus based on analyses of the C-terminal region of the nucleoprotein has demonstrated a limited diversity between circulating strains, making it difficult to determine the origin of the virus by this genomic region alone. The objective of this study was to genetically characterise the D4 genotype of measles viruses detected in Brazil from 2003 to 2012 by analysing sequences from the complete H gene and partial N gene of the virus. Cases positive for measles genotype D4 were previously identified by the amplification of a 450nt of the C-terminal region of the N protein by RT-PCR. The complete H gene from these samples was amplified by RT-PCR directly from clinical samples and subsequently sequenced. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the N gene and the complete H gene demonstrated that the measles D4 genotype detected in Brazil may have been a result of several importations of different variants of the same genotype circulating in Europe. Mutations were identified in the amino acid sequences of the N gene and complete H gene but they do not appear to change the immunological and antigenic properties of the virus.

Keywords: measles virus; genotype D4; N protein; haemagglutinin

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico: A Doença

A origem do sarampo é desconhecida, nos manuscritos da antiguidade esta doença é confundida com a varíola. Hipócrates não mencionou o sarampo entre as suas descrições as doenças infantis, e isso foi interpretado como evidência de que a doença não estava presente nas populações humanas primitivas, apesar de o sarampo ter sido confundido com outras doenças. No tempo de Hipócrates, a população humana era provavelmente muito pequena e muito isolada para suportar epidemias do vírus do sarampo, que requer uma quantidade mínima de 200-300.000 pessoas susceptíveis para sustentar a infecção (Keeling, 1997; Keeling & Grenfell, 1997).

Apesar da pouca informação existente sabe-se que uma enfermidade com as características do sarampo, foi a causa de muitas mortes no império Romano nos anos 165-80 e 251-66 D.C.. Na China, as duas epidemias com maior taxa de mortalidade ocorreram nos anos 161-162 e 310-312 D.C. O primeiro manuscrito científico que descreveu o sarampo como uma síndrome, diferenciando-o de outras infecções como a varíola, data do ano 910 D.C. e foi escrito por Muhammad ibn Zakariya ar-Razi, médico persa conhecido como Rhazes. Na sua obra chamada "*Tratamento da Varíola e do Sarampo*", Rhazes considerou que o sarampo era uma patologia mais perigosa que a varíola. Por volta do ano 1000, Avicenna escreveu também sobre sarampo, introduzindo o termo rubéola para a doença. Na era medieval, o sarampo foi referido no termo em latim: *morbilli* ("doença menor"), o diminutivo de *morbus* ("doença"). Também nesta época, o sarampo foi chamado de rubéola, rossalia e rosagia. Epidemias identificadas como sarampo foram reportadas no século XI e XII, tendo sido relatado como doença infantil pela primeira vez em 1224 (McNeil, 1976; Kiple, 1993; Black, 1997; Keeling & Grenfell, 1997; Griffin, 2007).

As complicações associadas ao sarampo foram relatadas e descritas inicialmente no século XVII. Em 1790, James Lucas, um cirurgião Inglês, descreveu o primeiro caso de encefalomielite pós-sarampo em uma mulher jovem (Lucas, 1970). A Pan-Encefalite Subaguda Esclerosante (PESE) foi primeiramente descrita em 1933 por Dawson, em um menino com deterioração neurológica progressiva (Dawson, 1933).

No entanto, a maioria dos princípios básicos de epidemiologia e infecção do sarampo foi elucidada em 1939, por Peter Panum, um médico holandês, durante uma grande epidemia nas Ilhas Faroé em 1846. Panum deduziu sobre a natureza altamente contagiosa da doença, tempo de incubação de 14 dias, imunidade duradoura presente em residentes idosos e ainda postulou a transmissão através da via respiratória (Panum, 1939).

1.2. Vírus do Sarampo

O vírus do sarampo pertence à família *Paramyxoviridae*, ele não apresenta a enzima neuraminidase associada ao virion, sendo por isso agrupado em um gênero separado, *Morbillivirus* (Kingsbury *et al.*, 1978). Fazem parte deste gênero outros vírus, incluindo: *Peste-des-petits-ruminants virus* (PPRV) que infecta carneiros e cabras, *Rinderpest virus* (RPV) agente da peste bovina, *Canine distemper virus* (CDV) infecta cães, *Phocine distemper virus* (PDV) que infecta focas e leões marinhos, *Dolphin Proprise morbillivirus* infecta golfinhos e botos (Kingsbury *et al.*, 1978; Lamb & Kolakofsky, 2001; Barrett & Rima, 2002; Griffin, 2007).

O termo *Morbillivirus*, provém de um diminutivo *Morbus*, que significa doença, além disso, referia-se a doença maior, a peste bubônica (Carmichael, 1997). Segundo Wilson (1962), a doença era conhecida no continente Europeu como *Morbili*, que seria a doença menor empregado para distingui-la da peste, porém *Morbili* incluía várias doenças exantemáticas (Wilson, 1962).

Filogeneticamente, o vírus do sarampo assemelha-se mais ao “rinderpest” vírus (patógeno do gato recentemente erradicado), e provavelmente tenha evoluído a partir de um vírus ancestral comum, um *Morbillivirus animal*, uma infecção zoonótica em comunidades nas quais o gato e o homem viviam muito próximos (McNell, 1976). Acredita-se que o vírus do sarampo tenha se estabelecido na população, a cerca de 5000-10000 anos atrás, nas civilizações do Middle Eastern River Valley, quando a população humana alcançou uma densidade suficiente para manter a transmissão do vírus (Black, 1966; Black, 1997). No entanto, análises filogenéticas sugerem uma recente divergência, a partir do vírus rinderpest no século XI e XII (Furuse *et al.*, 2010).

A descrição da etiologia viral da doença foi possível, em 1911, quando Goldberger e Anderson demonstraram experimentalmente a transmissibilidade do agente do sarampo, ao inocularem em um macaco o sangue humano de um caso agudo (Goldberger & Anderson, 1911).

O vírus do sarampo foi isolado pela primeira vez, em 1954, por John Enders e Thomas Peebles, a partir do sangue de uma criança infectada, que foi inoculado em células de rim de macaco. A partir destes estudos foi possível estabelecer testes de neutralização para avaliação da imunidade. Tendo sido observado, ainda, que a técnica de fixação de complemento poderia ser útil no diagnóstico sorológico da doença (Enders *et al.*, 1957; Black, 1982).

A partir da atenuação do vírus do sarampo em múltiplas passagens em células embrionárias de galinha em 1960, foi possível produzir a primeira linhagem vacinal. Possibilitando assim desenvolver a primeira vacina de vírus atenuado, licenciada em 1963 nos Estados Unidos (Auwaerter *et al.*, 1999).

1.2.1. Morfologia, características físico-químicas e genoma viral

As partículas virais do sarampo são estruturas pleomórficas, envelopadas, medindo aproximadamente 100 a 300 nanômetros (nm) de diâmetro. Um envelope lipídico, derivado da membrana plasmática recobre o nucleocapsídeo, e possui duas glicoproteínas transmembranas: a hemaglutinina (H) e a proteína de fusão (F). Ambas possuem uma porção projetada para o exterior do envelope. Associada à parte interna do envelope, encontra-se a proteína de matriz (M). O nucleocapsídeo composto pela nucleoproteína (N) viral e associado ao genoma de RNA, possui simetria helicoidal de 21nm de diâmetro. As proteínas L e P formam o complexo transcricional e encontram-se associadas com o RNA (Griffin, 2007). O vírus do sarampo encontra-se esquematicamente representado na figura 1-1A.

O vírus do sarampo permanece infeccioso no ar ou sobre superfícies infectadas por até duas horas. Ele é muito sensível ao calor e é inativado após 30 minutos a 56 °C. O vírus é inativado por solventes, tais como éter, clorofórmio, ácidos (pH<5), bases (pH>10), e

pela UV, é também susceptível a muitos desinfetantes, incluindo cloreto de sódio a 1%, álcool a 70% e formalina (WHO, 2007).

O genoma é formado por uma fita simples de RNA, não segmentado e polaridade negativa com 15.894 nucleotídeos. O genoma é composto por seis genes não sobrepostos que codificam para seis proteínas estruturais e duas proteínas não estruturais adicionais, que são codificadas na seguinte ordem N (nucleocapsídeo), P (fosfoproteína)/C/V, M (proteína de matriz), F (proteína de fusão), H (hemaglutinina), L (polimerase). A figura 1-1B mostra de forma esquemática a organização dos genes do vírus do sarampo, na sequência em que são sintetizados. Cada unidade transcricional é separada por uma região intragênica contendo um trinucleotídeo conservado “GAA” precedido por resíduos “U”, que representam um sinal de poliadenilação, seguido por um sinal de iniciação para o gene seguinte. A exceção fica entre os genes H e L no trinucleotídeo GCA (Crowley *et al.*, 1988)

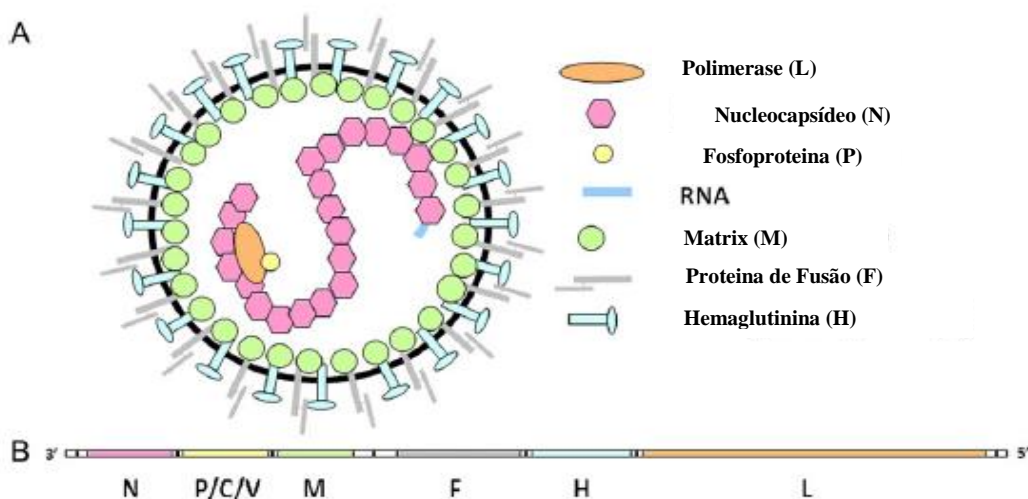


Figura 1-1: Representação esquemática do vírus do sarampo.

(A) Estrutura do vírus do sarampo. (B) organização do genoma do vírus do sarampo. Os retângulos coloridos representam a região codificada, e os retângulos brancos representam as regiões não codificadas. As barras pretas verticais representam os trinucleotídeos intragênicos.

Adaptado de Bankamp et al 2011 (Bankamp *et al.*, 2011)

1.2.2. Proteína N

O RNA viral é envolto pela proteína N, a mais abundante das proteínas virais, constitui o nucleocapsídeo. O nucleocapsídeo juntamente com as proteínas P e L forma o

complexo ribonucleoproteína (RNP) que serve de molde para a transcrição, replicação e empacotamento da progênie viral (Lund *et al.*, 1984; Sedlmeier & Neubert 1998; Marie *et al.*, 2004).

A sequência de aminoácidos (1-400 aa) da proteína N na região amino terminal (NH₂-terminal) é bem conservada, porção necessária para a montagem da própria proteína em partículas semelhantes à nucleocapsídeos, isto quando não existem outras proteínas virais (Liston *et al.*, 1997; Myers *et al.*, 1999; Lamb & Kolakofsky, 2001), e nesta região também observa-se a ligação com o RNA (Myers *et al.*, 1997; Kouznetzoff *et al.*, 1998; Myers *et al.*, 1999) (Figura 1-2). Entretanto, existe uma região de variabilidade entre os resíduos de aminoácidos (aa) 130 e 150 da região NH₂-terminal, que não se sabe o seu significado. Estas partículas semelhantes à nucleocapsídeos migram para o núcleo e são correlacionadas com os corpos de inclusões, que são característicos dos *Morbillivirus* (Gombart *et al.*, 1993; Bankamp *et al.*, 1996; Karlin *et al.*, 2002).

A região carboxi-terminal (COOH) da proteína N (401–525 aa) é hipervariável, e contém um dos sítios de ligação com a proteína P (Bankamp *et al.*, 1996) e M (Iwasaki *et al.*, 2009). O resíduo de aminoácido N522 está relacionado com a interação com o hsp72 (proteína do choque térmico - “70-KDa heat shock proteína”) (Zhang *et al.*, 2005) que promove a síntese de RNA e propagação do vírus do sarampo (Carsillo *et al.*, 2006). A variação nos 125 aminoácidos (1216 aos 1625 nt) da região carboxi-terminal da proteína, localizados na porção mais externa do nucleocapsídeo viral, reflete-se na variação das cepas (Gombart *et al.*, 1993; Griffin, 2007). A análise da sequência de nucleotídeos da região COOH-terminal da proteína N tem sido útil na epidemiologia e na identificação de genótipos (Taylor *et al.*, 1991; Baczko *et al.*, 1992; Rota *et al.*, 1994; Longhi *et al.*, 2003; Rota *et al.*, 2009) (Figura 1-2).

Em um estudo realizado por, Buckland e colaboradores (1989) foram identificados na nucleoproteína três distintos sítios antigênicos. O sítio antigênico identificado em todas as cepas do vírus do sarampo estudadas foi designado por sítio I e encontra-se localizado entre os aminoácidos 122-150. Os outros dois epítomos variáveis foram localizados na região COOH-terminal da proteína, sítio II entre os aminoácidos 457-476 e o sítio III entre 519-525 aa. Entretanto, as implicações estruturais e biológicas desses sítios antigênicos permanecem em discussão (Buckland *et al.*, 1989).

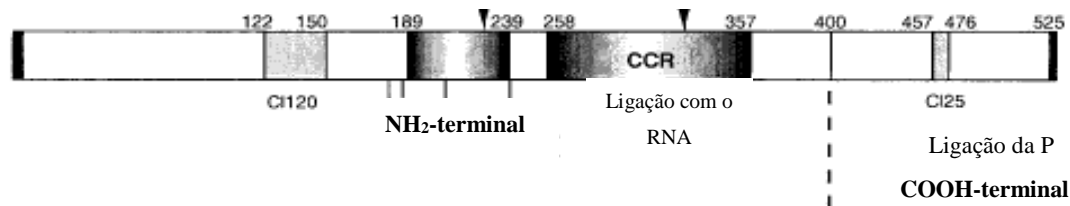


Figura 1- 2: Organização da Proteína N.

A proteína N é dividida em duas regiões: NH₂-terminal (1-400 aa) e COOH-terminal (401-525 aa). Estão indicados os epítomos dos anticorpos monoclonais C120 e C125 e as regiões de ligação com a proteína P e o RNA.

Fonte: Karlin D et al, 2002 (Karlin *et al.*, 2002)

1.2.3. Proteína P

O gene P codifica para três produtos gênicos, dois deles, a proteína P e a proteína acessória C, que são codificados pelo mesmo mRNA, mas traduzidos usando códons de iniciação em diferentes fases de leitura. O AUG utilizado para o gene C localiza-se 19 nucleotídeos abaixo do utilizado para o gene P (Bellini *et al.*, 1985). A proteína C está ligada a infecciosidade viral (Devaux & Cattaneo 2004). Ela interfere com a capacidade da célula de responder à sinalização do interferon α/β , prevenindo o estabelecimento do estado antiviral (Shaffer *et al.*, 2003; Yokota *et al.*, 2003). Outra função descrita é a regulação da síntese de RNA (Reutter *et al.*, 2001). A outra proteína acessória V, o terceiro produto do gene P, é codificada num mRNA que difere do mRNA do gene P pela inserção de um resíduo extra de guanosina (G) na posição 751, que torna a extremidade carboxi-terminal rica em cisteína. A proteína V é fosforilada e distribuída de maneira difusa no citoplasma de células infectadas (Wardrop & Briedis 1991; Gombart *et al.*, 1992; Liston & Briedis 1994). Apesar de ser dispensável para a replicação em cultura de células (Schneider *et al.*, 1997), a proteína V é essencial para a virulência (Kato *et al.*, 1997). Sua principal função parece ser a interferência com os mecanismos de defesa do hospedeiro, em particular a modulação da ativação do interferon e a regulação da expressão gênica (Palosaari *et al.*, 2003; Witko *et al.*, 2006). Em estudos experimentais com macacos infectados a proteína V inibiu a resposta inflamatória em monócitos infectados no sangue periférico (Devaux *et al.*, 2008).

1.2.4. Proteína M

A proteína M do vírus do sarampo é uma proteína básica de 335 aminoácidos com várias regiões hidrofóbicas não polares, conservadas que provavelmente interagem com os lipídeos da membrana celular. Nas células infectadas a proteína M está associada com o revestimento interno da membrana plasmática e com os nucleocapsídeos (Hirano *et al.*, 1992). A deleção da proteína M aumenta a fusão célula-célula e diminui a produção de vírus infeccioso (Cathomen *et al.*, 1995). A proteína M dirige a montagem viral e é responsável pelo brotamento do vírus (Lamb & Kolakofsky, 2001; Rima & Duprex, 2006). A capacidade de se ligar ao nucleocapsídeo e inibir a transcrição são frequentemente defeituosas nas proteínas M de vírus que causam infecções persistentes, o que pode ser resultado do alto grau de hipermutações observadas na proteína M destas infecções (Hirano *et al.*, 1993).

1.2.5. Proteína F

A proteína F é uma glicoproteína transmembrana tipo I (533 aa) altamente conservada (Richardson *et al.*, 1986). Ela medeia a fusão entre o vírus e a célula infectada ou entre a célula infectada e uma célula adjacente, cumprindo o papel essencial de espalhar o vírus pelo organismo. A proteína F é sintetizada como um precursor inativo F₀ que é ativado por uma clivagem proteolítica realizada no *trans* Golgi por proteases do tipo furina, em subunidades F1 e F2 unidas por uma ponte dissulfídica, o que confere à molécula fusão ativa e infectividade viral, conseqüentemente, permitindo propagação do vírus célula a célula (Sato *et al.*, 1988; Watanabe *et al.*, 1995; Bolt & Pedersen 1998; Maisner *et al.*, 2000). As glicoproteínas F e H interagem entre si para formar o complexo de fusão ativo. A ligação da proteína H aos receptores celulares, provavelmente induz uma alteração estrutural na proteína F ativando o processo de fusão (Wild *et al.*, 1991).

1.2.6. Proteína H

A proteína H (hemaglutinina) localiza-se na superfície das células infectadas ou dos vírions, como homodímeros ligados por pontes dissulfeto (Alkhatib & Briedis, 1986). O gene H abrange os nucleotídeos 7271-9124 resultando numa glicoproteína de cerca de 80 kD (Alkhatib & Briedis, 1986). Ela é uma glicoproteína transmembranosa tipo II (617

aa) que, compreende uma extremidade citoplasmática N-terminal, um segmento abrangendo a membrana e uma região stalk da membrana extracelular seguida de uma grande cabeça em forma de cubo com seis estruturas em forma de lâminas de β -hélices que interagem com o receptor (Navaratnarajah *et al.*, 2011) (Figura 1-3). Após síntese e glicosilação no retículo endoplasmático, a proteína H forma dímeros que são transportados para o aparelho golgi para a modificação do oligossacarídeo e, só dessa forma, a proteína madura é transportada para a membrana (Ogura *et al.*, 1991). Na proteína H a glicosilação é necessária para a conformação adequada, antigenicidade, dimerização e transporte da proteína através do Golgi (Hu *et al.*, 1994). Os cinco sítios potenciais de glicosilação (N-X-S) são 169-171 aa, 188-190 aa, 200-202 aa, 215-218 aa, e 238-240 aa (Alkhatib & Briedis, 1986). Os 34 aminoácidos que compõem a extremidade citoplasmática interagem com a proteína M e contém o sinal de ordem para a localização intracelular (Moll *et al.*, 2001).

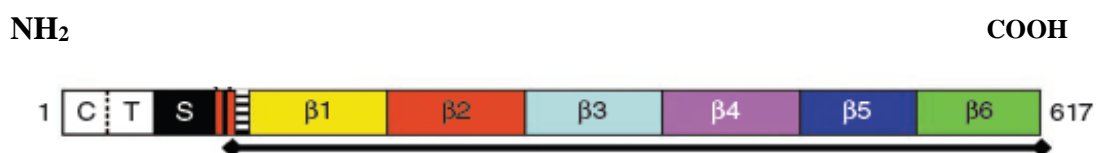


Figura 1- 3: Estrutura primária da proteína H.

C, extremidade citoplasmática; T, região transmembrana; S, stalk; $\beta 1$ – $\beta 6$, lâminas β hélices 1–6.

Fonte: Adaptado de Navaratnarajah et al 2011 (Navaratnarajah *et al.*, 2011)

A hemaglutinina é responsável pela ligação inicial do vírus com a superfície das células e também responsável pela hemaglutinação (Wild *et al.*, 1991), tendo sido postulado que o aminoácido 416 afeta a hemaglutinação (Saito *et al.*, 1995). Esta proteína aglutina somente hemácias de macaco em especial, hemácias de macaco verde africano (Peries & Chany, 1962). A hemaglutinina possui pelo menos quatro sítios antigênicos e até nove epítomos (Gly-49-Asp/Val e Phe-552-Val; Ser-313-Leu ou Gly-314-Arg; Ser-189-Pro, Gly-211-ser, Gly-388-Asp e; Ser532Phe ou Arg533Gly) (Hu *et al.*, 1993), incluindo um epítomo das células B nos aminoácidos 188-199 e 309-318 (Makela *et al.*, 1989; Partidos *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1993). Os anticorpos direcionados contra esta proteína têm tanto atividade de inibição de hemaglutinação (HI), quanto neutralizantes (NT) para o vírus. Também estão presentes nesta proteína, 13 resíduos conservados de cisteína, em particular cisteínas 381, 386 e 396, que desempenham um papel crítico na

oligomerização e transporte da proteína para a superfície. Sendo que alterações nestes locais conhecidos por induzir neutralização e anticorpos protetores, podem alterar o reconhecimento imunológico da proteína viral (Hu & Norrby, 1994; Ziegler *et al.*, 1996).

A proteína H também estaria envolvida na determinação do tropismo viral (Ohgimoto *et al.*, 2001), sendo que a proteína do vírus selvagem (e não a do vacinal) seria capaz de ativar células via TLR-2 (receptores toll-like 2), contribuindo para a ativação imune e para a disseminação viral pelo aumento na expressão do seu receptor CD150, e monócitos (Bieback *et al.*, 2002). A hemaglutinina colabora com o peptídeo de fusão (proteína F), mediando a fusão e entrada do vírus na célula. Os resíduos de 98 aa e a região entre os resíduos de aminoácidos 244 a 250 da proteína estão implicados na cooperação funcional de H com F (Wild *et al.*, 1991; Hummel & Bellini, 1995; Fournier *et al.*, 1997).

Após análises das sequências da hemaglutinina, foi possível localizar maior superfície antigênica entre dos resíduos dos aminoácidos 368 e 396, que pode ser funcionalmente importante para neurovirulência (Liebert *et al.*, 1994).

1.2.7. Proteína L

A Proteína L ou polimerase viral é a maior proteína viral (2183 aa) a assume-se que contenha todas as atividades enzimáticas necessárias para a transcrição e replicação do vírus do sarampo (Horikami *et al.*, 1994; Bankamp *et al.*, 2002; Kingston *et al.*, 2004). A proteína L contém seis domínios altamente conservados que foram identificados por comparação de sequências. O papel exato dos vários domínios não é claro, mas mutações em alguns destes domínios resultou em proteína L que embora seja capaz de transcrever o mRNA viral, é defeituosa na replicação viral (Poch *et al.*, 1990; Sidhu *et al.*, 1993). Os 408 aa NH₂-terminal da proteína L contém o domínio de ligação com a proteína P, esta interação confere estabilidade para a proteína L (Hamaguchi *et al.*, 1983; Horikami *et al.*, 1992). Presume-se que este domínio seja importante para formação do complexo RNA polimerase (Horikami *et al.*, 1994).

1.3. Características antigênicas

O vírus do sarampo tem sido considerado um vírus antigenicamente estável monotípico. A capacidade de neutralização do vírus por anticorpos monoclonais específicos para a proteína H tem sido mantida há décadas, embora com uma eficácia variável (Klinge *et al.*, 2000). No entanto, a variabilidade, principalmente nos genes N e H foi reconhecida por análise da sequência de nucleotídeos (Rota *et al.*, 1992; Rima *et al.*, 1997), e reatividade do anticorpo monoclonal (Giraudon *et al.*, 1988; Tamin *et al.*, 1994).

A proteção contra re-infecção é mediada tanto pelos anticorpos específicos para o vírus do sarampo como pelas células T específicas para o vírus do sarampo (Duke & Mgone, 2003). Os anticorpos neutralizantes são direcionados contra as duas glicoproteínas de superfície, a hemaglutinina e a proteína de fusão. Esses anticorpos bloqueiam a interação da proteína H com os seus receptores celulares e ainda a atividade de fusão (Bouche *et al.*, 2002). Foi demonstrado que os anticorpos específicos contra a proteína H representam o principal vínculo para a neutralização do vírus do sarampo induzida pela vacina (de Swart *et al.*, 2005). E esses anticorpos são principalmente direcionados contra epítomos conformacionais da proteína H (Bouche *et al.*, 2002). No entanto os anticorpos monoclonais derivados pelo vírus vacinal (BH6 e BH216) neutralizam eficientemente todos os genótipos do vírus do sarampo pelo reconhecimento do epítomo correspondente na hemaglutinina (HNE; aa 379–410) (Ziegler *et al.*, 1996; Ertl *et al.*, 2003; Santibanez *et al.*, 2005). E este domínio HNE, contém três resíduos cisteínas (C381, C386 e C394) formando a porção exposta na superfície (Ziegler *et al.*, 1996).

As sequências de nucleotídeos dos genes L, M e F (Rota *et al.*, 1994; Bankamp *et al.*, 1999) são muito menos variáveis do que as sequências dos genes N, P e H, que têm 7%-10% de variabilidade (Rota *et al.*, 1992; Rima *et al.*, 1997; Bankamp *et al.*, 2008). As sequências de genes N e H são mais comumente usados para a caracterização genética do vírus do sarampo (Rota *et al.*, 2009).

A proteína N do vírus do tipo selvagem apresentam heterogeneidade antigênica e os genes N diferem por aproximadamente 12% na região correspondente aos 450 nucleotídeos, que codifica para os 150 aminoácidos da parte COOH terminal (Giraudon *et al.*, 1988; Buckland *et al.*, 1989). A sequência de nucleótidos do gene H é

completamente variável, especialmente entre os resíduos 167 e 241, onde estão localizados os cinco sítios potenciais de glicosilação ligados a N (Rota *et al.*, 1992).

A OMS recomenda o sequenciamento dos 450 nucleotídeos que codifica para os 150 aminoácidos da parte COOH terminal da proteína N, como sendo os dados mínimos para a genotipagem do vírus do sarampo a partir de isolados ou direto de amostras clínicas. A análise filogenética da sequência do gene H completo fornece um suporte adicional para a atribuição de um novo genótipo, estabelecer a cadeia de transmissão do vírus, e monitorar substituições de aminoácidos que possam afetar a antigenicidade (Rota *et al.*, 2009).

A análise da variação de nucleotídeos entre as cepas do vírus do sarampo do tipo selvagem indicou a existência de oito grupos (A-H). E de 24 subgrupos referidos com genótipos (A, B1-B3, C1, C2, D1-D11, E, F, G1-G2, H1, H2). No entanto, nem todos os genótipos reconhecidos ainda estão em circulação, seis genótipos não têm sido relatados neste século apesar das melhorias da vigilância epidemiológica molecular (B1, C1, D1, E, F e G1) e podem ser considerados como "inativos". Adicionalmente, cinco genótipos não têm sido detectados desde 2006 (D2, D3, D10, G2 e H2), sugerindo que eles podem estar inativos, com a advertência de que ainda existem as falhas na vigilância. Praticamente todos os casos do genótipo A recentemente identificados foram de pacientes recentemente vacinados, isto pelo fato da vacina ser derivada de uma linhagem do vírus do sarampo genótipo A atenuada em cultura de células. Os últimos supostos vírus do tipo selvagem do genótipo A foram relatados de dois casos esporádicos em 2008 (WHO, 2012).

1.4. Receptores virais

A infecção de células pelo vírus do sarampo é iniciada pela ligação da hemaglutinina a receptores celulares (Rima & Duprex, 2006). O primeiro receptor celular para o vírus do sarampo a ser identificado foi CD46 (*membrana cofactor protein-MCP*), uma glicoproteína transmembranar que pertence à família dos reguladores de ativação do complemento e é expresso em células humanas nucleadas (Naniche *et al.*, 1992; Dorig *et al.*, 1993; Naniche *et al.*, 1993). Resíduos de aminoácidos que interagem com a CD46 na proteína H foram identificados (F431, V451, Y481, P486, e I487) (Masse *et al.*,

2002; Santiago *et al.*, 2002; Vongpunsawad *et al.*, 2004). Entre eles, dois resíduos de aminoácidos (V451 e Y481) são cruciais para a determinação da habilidade das estirpes do vírus do sarampo para causar hemadsorção, fusão celular e baixa regulação do receptor CD46 (Sato *et al.*, 2012). No entanto, logo após sua descoberta, tornou-se evidente que somente a vacina e as linhagens do vírus do sarampo adaptadas em laboratório poderia utilizar o CD46 como receptor (Buckland & Wild 1997). Curiosamente, tem sido mostrado que as cepas do vírus do sarampo que podem usar CD46 *in vitro* dificilmente usam este receptor *in vivo* (de Vries *et al.*, 2010; Takeuchi *et al.*, 2012).

Em 2000, a molécula sinalizadora de ativação de linfócitos (SLAM ou CD150), foi identificada como sendo um receptor celular para vírus do sarampo do tipo selvagem (Tatsuo *et al.*, 2000). O SLAM serve como um receptor comum que confere a adsorção do vírus e formação de sincício em várias estirpes do vírus do sarampo, tais como, cepas vacinais, cepas do tipo selvagem e vários vírus recombinantes (Tatsuo *et al.*, 2001). O CD150 é expresso principalmente em subconjuntos de linfócitos e células dendríticas (DC) (Sidorenko & Clark, 1993; Cocks *et al.*, 1995; Kruse *et al.*, 2001; McQuaid & Cosby, 2002; Veillette, 2006), mas também em células de Langerhans ativadas (LC), macrófagos (Cocks *et al.*, 1995; van der Vlist *et al.*, 2011), em as células B ativadas, células T de memória e ativadas, incluindo células T regulatórias ativadas (Browning *et al.*, 2004), e tímócitos imaturo (Aversa *et al.*, 1997). A mutagênese da proteína H baseada na sua habilidade para induzir a fusão célula-célula SLAM-dependente revelou que os resíduos importantes para a interação com SLAM são I194, D505, D507, Y529, D530, T531, R533, H536, Y553, e P554 (Masse *et al.*, 2004; Vongpunsawad *et al.*, 2004; Navaratnarajah *et al.*, 2008).

Infecções experimentais de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) e cynomolgus (*Macaca fascicularis*) macacos com o vírus do sarampo expressando EGFP (*Green fluorescent protein*) demonstraram que linfócitos CD150⁺ e as células dendríticas foram predominantemente infectadas durante o pico da replicação do vírus (de Swart *et al.*, 2007). No entanto, a infecção das células epiteliais CD46⁻ e CD150⁻ pelo vírus do sarampo também tem sido observado *in vitro* e *in vivo* (Moench *et al.*, 1988; Andres *et*

al., 2003; Takeuchi *et al.*, 2003; Takeda *et al.*, 2007; Tahara *et al.*, 2008; Ludlow *et al.*, 2010).

Em 2011, dois grupos de pesquisa identificaram independentemente a Nectin-4, uma proteína de junção aderentes expressa pelas células epiteliais, como um receptor celular para o vírus do sarampo (Muhlebach *et al.*, 2011; Noyce *et al.*, 2011). Uma vez que a Nectin-4 é exclusivamente localizada no lado basolateral das células epiteliais, a sua identificação como receptor de vírus do sarampo é compatível com a observação de que as células epiteliais não podem ser infectadas apicalmente. Consequentemente, não são susceptíveis de serem células alvo iniciais para a infecção pelo vírus do sarampo (Sato *et al.*, 2012).

Além de receptores celulares de entrada, duas lectinas tipo-C lectinas DC-SIGN/CD209 e Langerhin, expressadas em subconjuntos de células dendríticas e células de Langerhans, funcionam como receptores reconhecimento e apresentação do vírus do sarampo para as células (de Witte *et al.*, 2006; van der Vlist *et al.*, 2011). O DC-SIGN desempenha um papel na transmissão do vírus do sarampo das células dendríticas para linfócitos T, que pode ocorrer independentemente da infecção das células dendríticas (de Witte *et al.*, 2008; van der Vlist *et al.*, 2011).

1.5. Replicação Viral

A infecção pelo vírus do sarampo inicia no trato respiratório, onde as células epiteliais respiratórias, os pneumócitos tipo I, e macrófagos alveolares são infectados (Moussallem *et al.*, 2007), mas se alguma, ou qual, destas células é o local inicial de replicação do vírus ainda não foi determinado (de Swart, 2008).

A ligação do vírus do sarampo ao receptor celular é feita via proteína H. Após a ligação da partícula viral ao receptor e por intermédio da proteína F, a membrana viral se funde com a membrana plasmática permitindo a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. A transcrição ocorre sequencialmente seguindo a ordem do genoma, com a síntese dos mRNAs N, P/C/V, M, F, H e L. A RNA polimerase se liga às sequências promotoras nos 100 primeiros nucleotídeos da extremidade 3' do RNA genômico. A transcrição termina imediatamente antes de um trinucleotídeo intergênico, num sinal de terminação

gênica seguido da poliadenilação, e a transcrição reinicia na posição da sequência de consenso do próximo gene sem transcrever o trinucleotídeo intragênico (3'-GAA-5'). A frequência com a qual cada RNA polimerase viral reinicia a transcrição do mRNA seguinte não é perfeita, levando a um gradiente de expressão gênica decrescente do gene N em direção ao gene L (Rima & Duprex, 2005). O ciclo de replicação do vírus do sarampo encontra-se esquematicamente representado na Figura 1-4.

O RNA viral parental (vRNA) de polaridade negativa, é copiado em uma fita de RNA complementar (cRNA) de polaridade positiva, a qual serve como molde para a síntese de novos RNA virais de polaridade negativa. O RNA viral é então copiado e metilado na terminação 5' e poliadenilado na terminação 3'. A síntese, tanto de RNA antigenômico (+) quanto do RNA genômico (-), está relacionado ao empacotamento concomitante de ambos pela proteína N (Lamb & Kolakofsky, 2001).

Após a tradução dos transcritos primários e o acúmulo das proteínas virais inicia-se a síntese do antigenoma. Durante a replicação a molécula nascente de RNA é imediatamente encapsidada pela proteína N e os sinais de terminação gênica, os trinucleotídeos intergênicos e os sinais de iniciação são ignorados, dando origem a uma fita positiva de RNA antigenômico. A síntese do genoma viral a partir do antigenoma ocorre de modo similar (Lamb & Kolakofsky, 2001).

A montagem viral acontece no citoplasma da célula infectada. Acredita-se que os nucleocapsídeos sejam montados em duas etapas. Primeiro, através da associação de unidades livres de proteína N com o genoma para formar a estrutura helicoidal de ribonucleoproteína e posteriormente com a associação do complexo P-L. A montagem do envelope viral ocorre na superfície celular. As glicoproteínas de membrana H e F são sintetizadas e glicosiladas no retículo endoplasmático e posteriormente passam por uma maturação conformacional no aparelho de golgi, antes de serem transportadas para a membrana citoplasmática como oligômeros para formar peplômeros H e F. Os nucleocapsídeos são transportados para a membrana celular, onde se associam com a proteína M e as glicoproteínas, de onde brotam para formar novas partículas virais (Lamb & Kolakofsky, 2001; Iwasaki *et al.*, 2009)

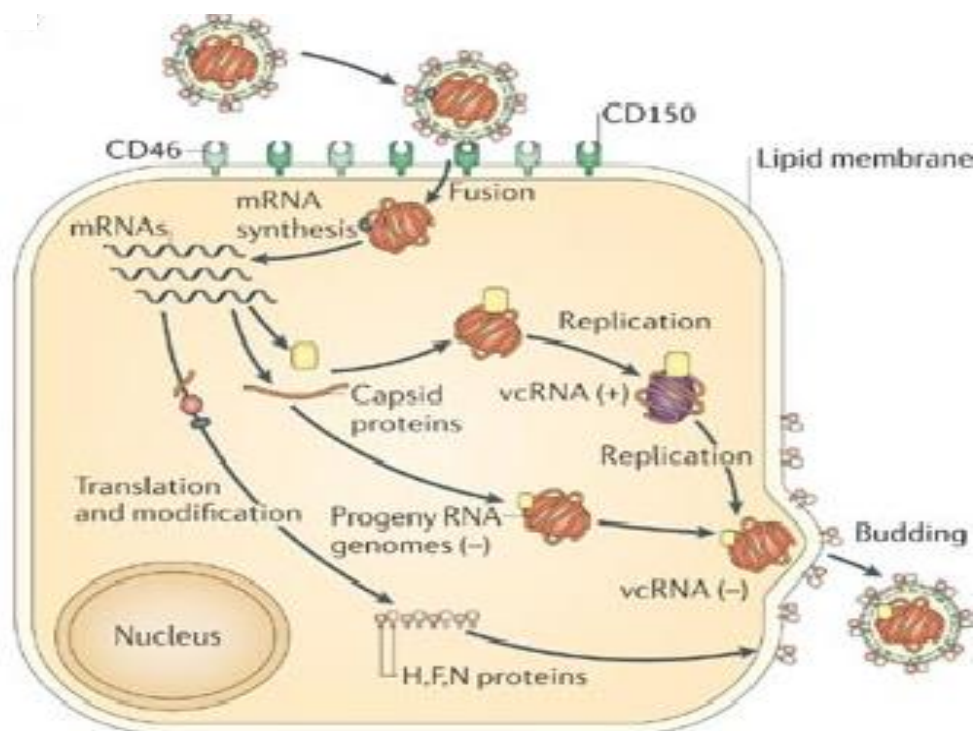


Figura 1- 4: Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus do sarampo.

A parte superior da figura ilustra a entrada de um virion, fusão do virion na membrana plasmática celular, seguida pela liberação do nucleocapsídeo helicoidal no citoplasma.

Fonte: (Moss & Griffin, 2006).

1.6. Patogênese do sarampo

O vírus do sarampo é transmitido pela via respiratória. Durante o período de incubação 10-14 dias entre a infecção e o aparecimento dos sintomas e sinais clínicos, o vírus do sarampo replica e se propaga no hospedeiro infectado (Moss & Griffin, 2006). A infecção inicia-se pela sua entrada nos macrófagos alveolares e células dendríticas no trato respiratório mediado pelo receptor SLAM (de Witte *et al.*, 2008; de Vries *et al.*, 2010). Essa infecção inicial permite que o vírus do sarampo penetre no corpo humano e alcance os tecidos ou órgãos linfóides, onde as células que expressam SLAM são abundantes (Corry *et al.*, 1984; Lehmann *et al.*, 2001). Após a replicação inicial nos tecidos ou órgãos linfóides, o vírus do sarampo ou os linfócitos infectados pelo vírus podem facilmente entrar na corrente sanguínea (Esolen *et al.*, 1993). Subsequentemente é observada uma dramática infecção pelo vírus em todos os órgãos, tais como epitélio oral (Suringa *et al.*, 1970), da pele (Suringa *et al.*, 1970; Moench *et al.*, 1988), dos pulmões (Moench *et al.*, 1988) baço, fígado, timo (White & Boyd, 1973), linfonodos, conjuntivas e superfícies mucosas dos tratos gastrointestinais, respiratório e urinário (Moench *et al.*, 1988; Kobune *et al.*, 1996; de Swart *et al.*, 2007; de Vries *et al.*, 2010).

A Figura 1-5 ilustra o modelo de infecção e transmissão do vírus do sarampo e, os órgãos infectados dias após a infecção inicial.

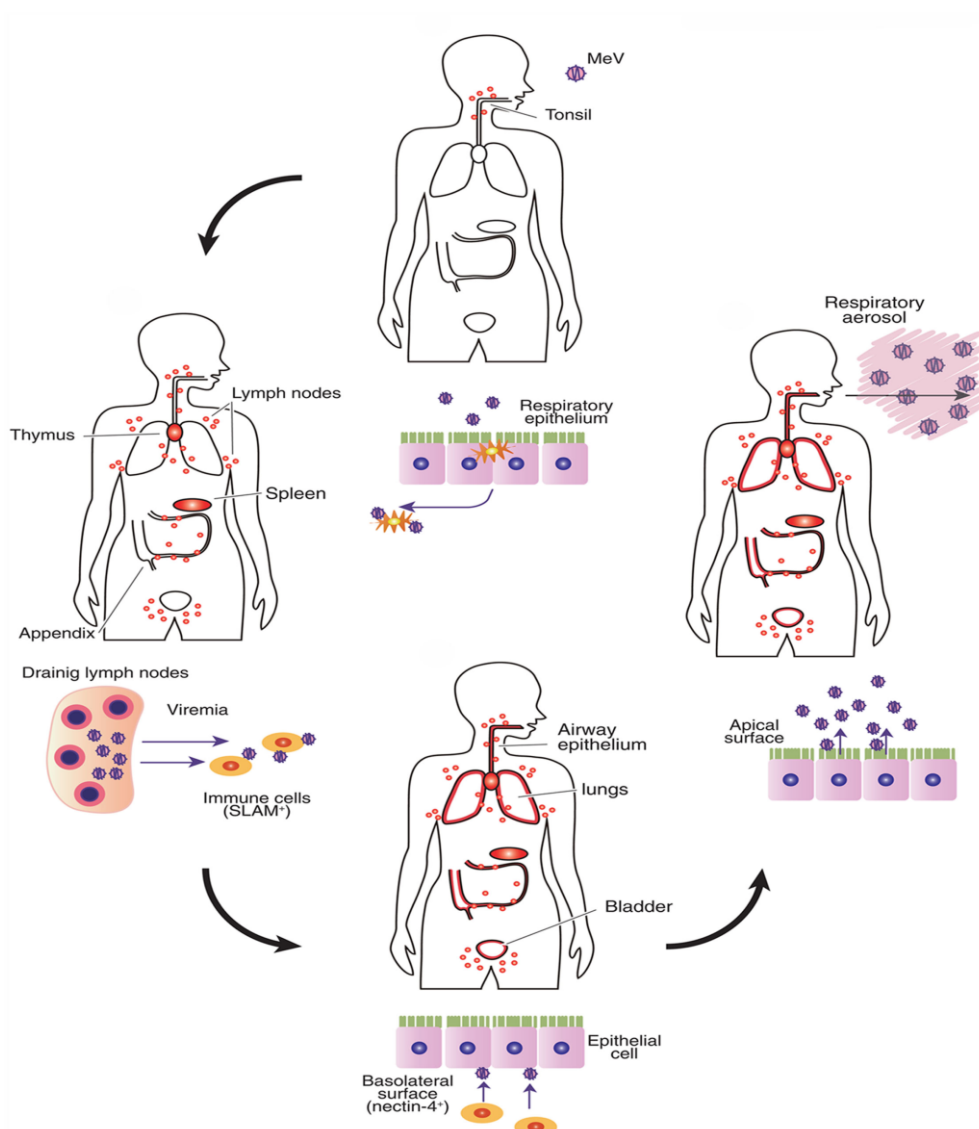


Figura 1- 5: Principal modo d transmissão do vírus do sarampo no corpo infectado.

(a) o vírus do sarampo entra por via respiratória, e, em seguida, infecta as células dendríticas, macrófagos e linfócitos no epitélio respiratório, mediado pelo receptor SLAM. (b) o vírus do sarampo é transportado para os linfonodos, onde células do sistema imunológico, predominantemente células T são infectadas, seguido por uma viremia associada às células que distribui a infecção para outros órgãos. (c) células imunes infectadas pelo vírus do sarampo transmitem o vírus para as células epiteliais em vários órgãos, tais como pulmão, bexiga, mediados pela molécula nectina-4. (d) os vírus são liberados do hospedeiro como aerossóis respiratórios.

Fonte: (Sato *et al.*, 2012)

Na corrente sanguínea, os monócitos são as primeiras células a serem infectadas pelo vírus do sarampo (Esofen *et al.*, 1993), mas experimentos *in vitro* mostraram que o vírus pode também se multiplicar em linfócitos T e B de sangue periférico (Joseph *et al.*, 1975; Hyypia *et al.*, 1985), e em células dendríticas (Fugier-Vivier *et al.*, 1997), sendo

capaz inclusive de induzir infecção persistente em linfoblastos (Joseph *et al.*, 1975) . Outro papel importante das células dendríticas na patogênese da doença seria o seu uso, pelo vírus do sarampo, como “cavalo de Tróia”, transportando-o do trato respiratório superior para os tecidos linfáticos onde, após um ciclo de replicação, o vírus se dissemina (Schneider-Schaulies *et al.*, 2003).

O linfotropismo do vírus e sua natureza imunossupressora seriam em parte explicados pela expressão frequente do receptor CD150 na superfície dessas células (Yanagi *et al.*, 2006), sendo que as células ativadas apresentariam maior capacidade de suportarem a multiplicação viral que as em repouso (Joseph *et al.*, 1975; Hyypia *et al.*, 1985; Fugier-Vivier *et al.*, 1997; Minagawa *et al.*, 2001). O acometimento das células do estroma da medula óssea também foi descrito, levando ao comprometimento do desenvolvimento das células tronco hematopoiéticas (Manchester *et al.*, 2002). Por outro lado, as células polimorfonucleares, parecem não ser susceptíveis (Moench *et al.*, 1988).

Apesar do vírus não ter sido encontrado no cérebro de pacientes com sarampo agudo (Moench *et al.*, 1988) e de ser discutível a sua presença em pacientes com encefalomielite pós-sarampo (Cherry & Shields, 1998), sua replicação estava aumentada em neurônios e em células da glia de pacientes com panencefalite esclerosante subaguda (Moench *et al.*, 1988). Acredita-se que uma mutação na cauda citoplasmática da proteína de fusão viral seja talvez a responsável pela propagação mais eficiente do vírus no cérebro desses pacientes, uma vez que a fusão entre as células seria a principal forma de disseminação viral no sistema nervoso central (SNC) (Cathomen *et al.*, 1998). Se por um lado a infecção viral do SNC parece ser de ocorrência pouco comum, foi notada pleocitose no líquido em cerca de 30% dos pacientes com sarampo agudo, sendo que 15% também apresentavam anticorpos no líquido contra o vírus do sarampo (Hanninen *et al.*, 1980).

1.7. Resposta Imune

A resposta imune ao vírus do sarampo, que é importante para o depuramento do vírus e recuperação da infecção, é também diretamente responsável pela maioria das manifestações clínicas (Griffin, 2007). O vírus do sarampo estimula uma resposta imune duradoura, apesar da imunossupressão observada durante a doença. Acredita-se que a

infecção sistêmica causada pelo vírus, com consequente multiplicação viral disseminada nos tecidos linfóides, resultaria em uma estimulação antigênica eficaz, favorecendo essa resposta permanente (McChesney *et al.*, 1997). Assim, apesar da leucopenia e da linfopenia observadas na fase aguda da doença (Arneborn & Biberfeld, 1983), que levariam a uma maior morbimortalidade, seria induzida, concomitantemente ao exantema, uma resposta celular potente, que promoveria o depuramento viral (Manchester *et al.*, 2002). É sabido que, uma semana após a erupção cutânea, não se consegue mais isolar o vírus em linfócitos de pacientes infectados (Whittle *et al.*, 1978, Pan *et al.*, 2005) mas no entanto o RNA viral persiste por muitas semanas.

Diferentes componentes da resposta imunitária são ativados durante a infecção pelo vírus do sarampo. A primeira resposta imune a ser ativada pela infecção pelo vírus do sarampo é a resposta imune inata, que contribui para o controle da replicação do vírus durante o período de incubação. Por outro lado, o início da doença clinicamente aparente coincide com o surgimento da resposta imune adaptativa específica ao vírus do sarampo (Griffin, 2007). Durante a infecção pelo vírus do sarampo foi notado um aumento no número e na ativação das células NK e ainda o aumento na expressão de IFN α e β (Okada *et al.*, 2000; Okada *et al.*, 2001; Moss & Griffin, 2006).

A resposta imune adaptativa consiste em resposta humoral e celular específica ao vírus do sarampo (Moss & Griffin, 2006). Na resposta imunológica contra o sarampo, a imunidade celular parece ter papel preponderante, sendo essencial para a superação da doença (Schneider-Schaulies & Dittmer, 2006). Consequentemente, pacientes com imunodeficiências humorais geralmente se recuperam bem do sarampo, enquanto aqueles com imunodeficiências celulares apresentam grandes riscos de complicações fatais (Bouchel *et al.*, 2002).

O vírus seria eliminado das células mononucleares de sangue periférico através de uma resposta imune celular específica e tanto os pacientes quanto os vacinados apresentam respostas protetoras duradouras (Schneider-Schaulies & ter Meulen, 2002). Clones de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ direcionados às proteínas hemaglutinina, fusão, matriz e nucleoproteína são detectados, ocorrendo predominância das células T CD8⁺ (Bouche *et al.*, 2002), indicando um papel primordial das mesmas na recuperação da doença (de Vries *et al.*, 2010).

Nos homens, os linfócitos citotóxicos aumentaram mais rapidamente na circulação após a doença e os níveis de CD8 solúvel eram maiores que os encontrados em mulheres, sendo talvez uma das razões para a menor mortalidade em indivíduos do sexo masculino (Ryon *et al.*, 2002). Tanto os linfócitos T CD4⁺ quanto os T CD8⁺ encontram-se ativados durante o exantema (Griffin & Ward, 1993; Griffin, 2007).

O surgimento da resposta imune contra o sarampo seria marcado pelo aparecimento de linfócitos T específicos, pela infiltração de células mononucleares em áreas de multiplicação viral e pelo aparecimento de anticorpos contra o vírus (Schneider-Schaulies *et al.*, 2003). A ativação dos linfócitos T CD4⁺ persiste por várias semanas após o desaparecimento do exantema (Griffin & Ward, 1993), promovendo auxílio aos linfócitos B para a geração de anticorpos específicos contra o sarampo (Bouche *et al.*, 2002). O primeiro anticorpo detectado após a infecção é do tipo IgM, ocorrendo depois uma mudança no isotipo para IgG (principalmente IgG1 e IgG4) (Schneider-Schaulies & ter Meulen, 2002). Apesar do anticorpo mais abundante ser aquele contra a proteína N e apesar de serem produzidos anticorpos contra a maioria das proteínas virais (Griffin, 2007), os únicos anticorpos neutralizantes e protetores seriam aqueles direcionados contra as glicoproteínas de superfície H e F (Bouche *et al.*, 2002).

A IgA sérica aumentaria nos dois primeiros dias depois do exantema, com pico após uma semana, permanecendo detectável por meses após a recuperação da doença. Quanto à IgE, não seriam detectáveis anticorpos específicos contra o sarampo, apesar de haver aumento policlonal que parece preceder a resposta imune específica e que teria seu pico uma semana após o início do exantema (Bouche *et al.*, 2002). Em pacientes com encefalomielite pós-sarampo os níveis de IgE permaneceram persistentemente elevados, comparados com os pacientes com complicações pulmonares ou com aqueles sem complicações (Griffin *et al.*, 1985). A Figura 1-6 ilustra a resposta imune, infiltração das células T CD4⁺ e T CD8⁺ e a síntese dos anticorpos IgM e IgG dias após a infecção

Experimentos com macacos também evidenciaram a presença de anticorpos neutralizantes, que surgiram entre os dias 7 e 14 após a infecção (Auwaerter *et al.*, 1999). Esses anticorpos neutralizantes seriam importantes na prevenção da infecção sistêmica, mas seria a imunidade celular que estaria relacionada com a recuperação da

infecção e que também preveniria o surgimento de doença mais grave (Zhu *et al.*, 1997).

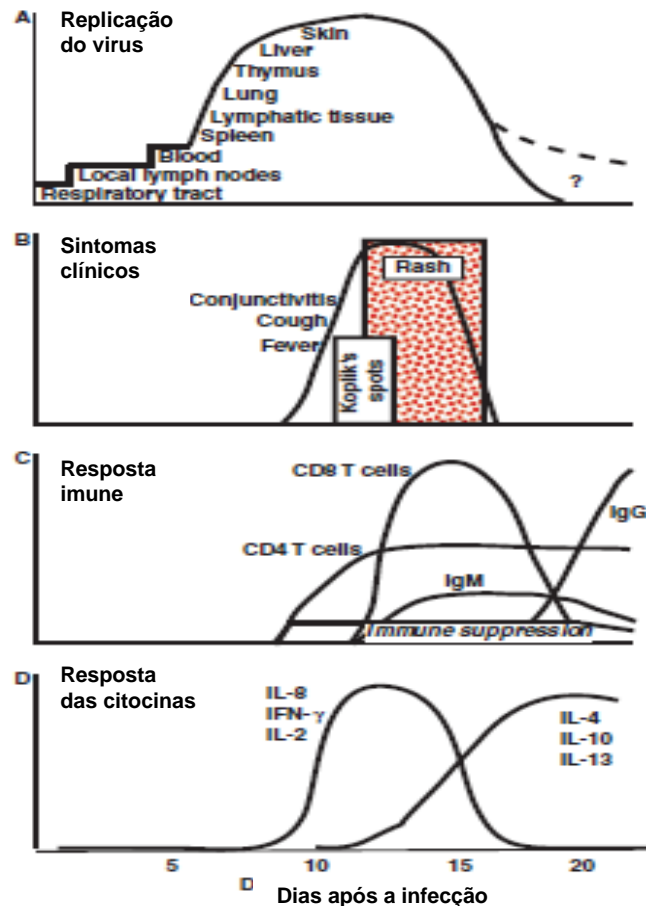


Figura 1- 6: Diagrama esquemático ilustrando uma visão geral da patogênese do sarampo desde o momento da infecção pelo vírus até a recuperação.

(A) Órgãos que são infectados pelo vírus do sarampo. (B) Os sintomas e sinais clínicos. (C) o curso da resposta imune e imunossupressão dias após a infecção inicial. (D) Vários tipos distintos de citocinas e quimiocinas, são produzidos durante a infecção.

Adaptado de Griffin et al 2010 (Griffin, 2010).

1.8. A imunossupressão induzida pelo vírus do sarampo

Hoje sabemos que a mortalidade associada ao sarampo estaria relacionada à capacidade do vírus em suprimir respostas imunes (Schneider-Schaulies *et al.*, 2003), favorecendo o surgimento e agravando o curso de infecções secundárias, que são também complicadas por fatores socioeconômicos como a desnutrição (Schneider-Schaulies & ter Meulen, 2002). Essa imunossupressão poderia causar infecções recorrentes até dois anos após a infecção aguda pelo sarampo (Bouche *et al.*, 2002).

A imunossupressão induzida pelo vírus do sarampo é caracterizada pela: produção anormal de citocinas, com um desequilíbrio na resposta Th2, resultando em uma deficiente resposta imunológica celular aos antígenos (Griffin & Ward, 1993) descrita *in vitro*; supressão das respostas linfoproliferativas à mitógenos e uma acentuada linfopenia (Ward *et al.*, 1991; Ryon *et al.*, 2002) observada *in vivo*. A supressão da imunidade celular ocorreria durante semanas a meses após o depuramento viral, sendo a principal causa das infecções secundárias e da mortalidade pelo sarampo (Manchester *et al.*, 2002). No entanto, acredita-se que a infecção dos linfócitos de memória também desempenha um papel importante no processo de imunossupressão (Condock *et al.*, 2007; de Swart *et al.*, 2007)

Mecanismos indiretos de imunossupressão têm sido relacionados com a natureza da resposta imune durante a recuperação, particularmente distorção da produção das citocinas tipo 2 das células T CD4 + e a indução de células T reguladoras (Griffin & Ward, 1993; Griffin *et al.*, 1994).

A diminuição da expressão da molécula CD46 pode aumentar a susceptibilidade da célula infectada à lise mediada pelo complemento (Schneider-Schaulies *et al.*, 1996). Assim, a interação de vírus do sarampo com CD46 poderia ser um fator importante a condução da estimulação de citocinas de tipo 2 e células T regulatórias durante as fases posteriores de recuperação do sarampo quando a imunossupressão é proeminente. No entanto, a importância desta interação proteína H do vírus do sarampo com o CD46 durante a infecção pelo vírus do sarampo não é claro, porque as cepas do tipo selvagem do vírus do sarampo não interagem eficientemente com CD46 (Bartz *et al.*, 1998; Ono *et al.*, 2001).

A predominância de citocinas Th2 após a resolução do exantema produz um ambiente que favorece a maturação de células B, que facilitam o estabelecimento da memória humoral importante para proteção à reinfeção ao longo da vida, enquanto deprime a ativação de macrófagos e indução da resposta tipo 1 que podem ser necessárias para combater novos patógenos (Hoffman *et al.*, 2003).

A internalização do CD150, secundária à sua ligação com a hemaglutinina viral (Tanaka *et al.*, 2002) e a destruição das células CD150⁺, observada nos pacientes infectados,

poderiam favorecer resposta imune do tipo 2 prolongada observada nos pacientes (Erlenhoef *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2001), que se exacerbada pode contribuir para o estado de imunossupressão causada pelo vírus (Tatsuo *et al.*, 2000). O processo de apresentação antigênica poderia também estar comprometido, uma vez que células dendríticas ativadas geralmente apresentam SLAM em sua superfície (Hsu *et al.*, 2001), levando a um maior efeito citopático pelo vírus (Murabayashi *et al.*, 2002). Desta forma, a infecção das células apresentadoras de antígeno levaria à interferência na maturação e na função das mesmas, afetando conseqüentemente a ativação das células T (Schneider-Schaulies & ter Meulen, 2002). A infecção pelo sarampo parece também contribuir para a disfunção de órgãos responsáveis pela produção e maturação de células imunes (Manchester *et al.*, 2002).

Apesar da imunossupressão causada pelo sarampo, acredita-se que a resposta imune desenvolvida seria capaz de levar ao depuramento viral, por outro lado, estudos têm demonstrado que a infecção persistente não só é possível, como pode ser muito mais comum do que se esperava, uma vez que foi detectado RNA viral em 20% espécimes cerebrais em necrópsias de pacientes adultos sem relato de doença neuronal pelo sarampo (Rall, 2003).

1.9. Manifestações clínicas

O sarampo é uma doença exantemática viral, altamente contagiosa, transmitida por via respiratória. Os primeiros sinais clínicos do sarampo iniciam 10 a 12 dias após a exposição ao vírus. O sarampo inicia com um período prodrômico que pode durar até sete dias, caracterizado por febre, tosse, coriza e conjuntivite (Griffin, 2007). Nesta fase surgem na mucosa oral, sinais de Koplik, pequenas lesões brancas, que podem permitir o diagnóstico clínico do sarampo antes do início do surgimento da erupção cutânea (Tierney, 2006). O aparecimento do exantema ocorre após 3-4 dias do início do período prodrômico, em média 14 dias após a exposição ao vírus e vem acompanhado do pico dos sintomas. A infectividade é maior nos 3-4 dias antes do aparecimento do exantema, entretanto há eliminação viral por até quatro dias após o aparecimento do exantema (Rall, 2003). Os primeiros sintomas pre-erupção são semelhantes aos de outras doenças respiratórias comuns (Perry & Halsey, 2004).

O exantema do sarampo caracteriza-se por uma erupção maculopapular e eritematosa que surge, inicialmente, na face e atrás das orelhas, e em seguida se espalha de forma centrífuga para o tronco e extremidades (Perry & Halsey, 2004). A figura 1-6 B ilustra a sequência do aparecimento dos sintomas ao longo dos dias após a infecção. O exantema dura cinco dias e desaparece na mesma ordem de seu aparecimento, da cabeça para as extremidades.

Em casos de sarampo sem complicações, a recuperação clínica inicia logo após o aparecimento do exantema. As complicações podem ocorrer em até 40% dos pacientes, e o risco de complicação é maior, em crianças menores de cinco anos e adultos acima de 20 anos (WHO, 2012). As complicações causadas pelo sarampo foram observadas em todos os órgãos e ocorrem devido à ruptura dos revestimentos epiteliais e a imunossupressão, deficiência em vitamina A (Perry & Halsey, 2004; WHO, 2012). As complicações pelo sarampo geralmente surgem nas primeiras quatro a seis semanas após a infecção e afeta principalmente o trato respiratório e intestinal (Schneider-Schaulies & ter Meulen, 2002).

As complicações pelo sarampo mais frequentes ocorrem no trato respiratório. A pneumonia é a complicação mais grave e é responsável pela maioria das mortes (Hussey & Clements, 1996). O risco de pneumonia é aumentado devido a imunossupressão induzida pelo vírus, bem como disfunção imunológica local dentro dos pulmões. A pneumonia é causada por infecções bacterianas ou virais secundárias ou, em pessoas imunocomprometidas, ou pelo vírus do sarampo em si. Outras complicações incluem laringotraqueobronquite (Crupe viral) e otite média (Schneider-Schaulies *et al.*, 2003), diarreias, mal nutrição e encefalites (Rall, 2003; Perry & Halsey, 2004; WHO, 2012).

As complicações pelo sarampo envolvendo o sistema nervoso central (SNC) são muito sérias. O sarampo quando afeta o SNC, provoca encefalite, uma inflamação do cérebro, em pelo menos, quatro paradigmas diferentes, cada um com patogênese e aspectos patológicos diferentes, (Buchanan & Bonthius, 2012), embora todos envolvam a interação do sistema imune-vírus-cérebro que causa disfunções sérias e permanentes ou até a morte (Bonthius & Karacay, 2002). Estes quatro paradigmas incluem encefalite primária (PME), encefalomielite pós-infecciosa aguda (APME), encefalite por corpos de inclusão (MIBE) e panencefalite subaguda esclerosante

(SSPE). Duas destas doenças (PME e MIBE) envolvem uma infecção contínua e ativa com o vírus do sarampo do tipo selvagem, enquanto, os outros dois (APME e SSPE) não (Buchanan & Bonthius, 2012).

Os Anticorpos para o vírus do sarampo podem desempenhar um papel no estabelecimento das infecções persistentes no CNS, tanto através da alteração da indução da resposta imunitária primária, no momento da inicial da infecção ou através da modulação da infecção uma vez que o vírus está no sistema nervoso (Endo *et al.*, 2001).

O sarampo pode infectar diretamente o cérebro no curso de uma infecção aguda, esta infecção direta do cérebro numa pessoa anteriormente saudável é referida como PME e ocorre em 1-3 por 1000 indivíduos infectados (Hosoya, 2006). Nesta doença, o vírus invade e replica-se dentro dos neurônios. Esta infecção do cérebro ocorre tipicamente durante a fase exantemática da doença sistêmica, mas raramente precede o aparecimento do exantema (Johnson *et al.*, 1984). A infecção intraparenquimatosa danifica diretamente os neurônios e desencadeia uma infiltração linfocítica no interior do parênquima cerebral e das meninges. Na PME, o vírus do sarampo pode ser isolado a partir de cérebro e do líquido cefalorraquidiano (LCR). Destes pacientes, 10% -15% chegam a morte, e adicional 25% terá sequelas neurológicas permanentes, incluindo convulsões e um retardo mental (Perry & Halsey, 2004; Ota *et al.*, 2005).

A segunda forma de inflamação do cérebro associada ao sarampo é imune mediada e não envolve a infecção viral direta do cérebro. Esta é referida como Encefalomielite pós infecciosa aguda (APME) ou encefalomielite disseminada aguda. É uma doença desmielinizante inflamatória aguda perivenular autoimune, que esta associada a uma resposta à proteína básica da mielina, geralmente não se encontrando o vírus no cérebro desses pacientes. A AMPE é a complicação neurológica mais comum após sarampo, ocorrendo em uma em cada 1000 crianças de dois anos (Kaneko *et al.*, 2002; Rima & Duprex, 2005) sendo a doença desmielinizante mais comum em humanos (Johnson *et al.*, 1984; Chowdhary *et al.*, 2009; Reuter & Schneider-Schaulies, 2010).

O prognóstico para pacientes com APME é melhor do que aqueles com PME. A taxa de mortalidade é de 10 a 20%, alguns têm uma recuperação completa (Johnson *et al.*,

1984). No entanto, alguns pacientes com este transtorno pós-infeccioso ficam com sequelas neurológicas substanciais e permanentes (Buchanan & Bonthius, 2012).

O sarampo em crianças imunocomprometidas pode dar origem a uma infecção progressiva do sistema nervoso central, denominada encefalite por corpos de inclusão (MBE) (Freeman *et al.*, 2004). O MIBE é uma complicação rara, mas fatal, associada com a deterioração neurológica progressiva que afeta indivíduos com imunidade celular defeituosa e geralmente ocorre entre 2 a 6 meses após a infecção aguda (Moss & Griffin, 2011). Esta complicação pode ocorrer em indivíduos que apresentaram infecção pelo vírus do tipo selvagem bem como após vacinação (Hughes *et al.*, 1993; Buchanan & Bonthius, 2012). A idade média dos casos relatados é seis anos (Mustafa *et al.*, 1993; Perry & Halsey, 2004). A taxa de mortalidade associada à MIBE é aproximadamente 75%, com a morte ocorrendo geralmente poucas semanas após o início da doença. Aqueles que sobrevivem a esta doença sofrem considerável morbidade a partir de anormalidades neurológicas (Buchanan & Bonthius, 2012).

A panencefalite esclerosante subaguda (SSPE) é causada pela persistência do vírus do sarampo no sistema nervoso central, ocorre em cerca de uma em 10.000 crianças (Mais frequente em rapazes do que em meninas) (Takasu *et al.*, 2003; Bellini *et al.*, 2005), e caracteriza-se por convulsões e deterioração progressiva das funções cognitivas e motoras, seguida de morte. O tempo médio para o aparecimento do SSPE após o sarampo é de 6 a 10 anos (Campbell *et al.*, 2007). A SSPE ocorre mais frequentemente em pessoas infectadas com vírus do sarampo antes dos dois anos de idade, quando o sistema imunológico ainda é imaturo e os anticorpos maternos residuais podem estar presentes (Bellini *et al.*, 2005). Em países em desenvolvimento com altas taxas de natalidade, o sarampo frequentemente ocorre em crianças jovens (Grais *et al.*, 2007; Moss, Fisher *et al.* 2008) e nesses países são registrados mais casos de SSPE (Takasu *et al.*, 2003). Estas altas taxas de SSPE são provavelmente mais exacerbadas quando existe uma alta prevalência da infecção pelo HIV, porque as crianças de mães infectadas pelo HIV têm maior risco de adquirir sarampo em uma idade precoce (Moss *et al.*, 2002). Modelos animais sugerem que uma infecção anterior com um vírus imunossupressor poderia aumentar a probabilidade de infecções persistentes no SNC (Oldstone *et al.*,

2005).A SSPE estaria associada a infecção de células neurais e da macróglia (Schneider-Schaulies, 2002).

As cepas do vírus do sarampo diferem na habilidade para estabelecer a infecção persistente na mesma célula hospedeira *in vitro* (Fernandez-Munoz & Celma, 1992), mas não existe nenhum agrupamento dos casos de SSPE o que sugere que o vírus do tipo selvagem que causa a infecção inicial é diferente do vírus que causa a doença não complicada (Griffin *et al.*, 2012).

1.10. Diagnóstico

As características clínicas clássicas de sarampo, febre, exantema maculopapular eritematoso, tosse, coriza, conjuntivite e manchas de Koplik, geralmente são suficientes para fazer o diagnóstico clínico, especialmente quando em presença de um surto na comunidade. No entanto, nem todos estes sinais e sintomas podem estar presentes e muitos destes, são compartilhados com outras patologias tais como: febre escarlatina, rubéola, parvovírus B19, herpesvírus-6 humano herpesvirus-7, humanos, meningococemia, doença de Kawasaki, síndrome do choque tóxico, dengue, e outras causas de erupção cutânea e febre (Griffin, 2007). Sendo assim, o diagnóstico laboratorial é fundamental na confirmação dos casos, principalmente em áreas com baixa incidência ou casos isolados sem vínculo epidemiológico.

As amostras clínicas (5-10 mL de sangue total, secreções nasofaríngeas e,15-100ml de urina) devem ser coletadas até o 5º dia a partir do aparecimento do exantema, preferencialmente nos primeiros 3 dias, não devendo ultrapassar 5 dias após o início do exantema. Em casos esporádicos, para não perder a oportunidade de se obter amostras de urina para o isolamento viral, o período pode ser estendido em até sete dias após a data do início do exantema. O diagnóstico laboratorial pode ser iniciado por testes sorológicos para a detecção de anticorpos específicos, o que torna imprescindível a coleta de amostra do sangue para a sorologia no primeiro contacto com o paciente (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009).

A detecção do vírus pode ser feita por isolamento viral em cultura de células e a partir de técnicas moleculares. Apesar do isolamento viral em cultura de células não ser

recomendado para diagnóstico, por ser demorado e laborioso, ele é importante para a vigilância epidemiológica, por permitir a caracterização da cepa através de técnicas moleculares. As técnicas moleculares usadas para a detecção do vírus do sarampo, RT-PCR, permitem a caracterização genética, a fim de conhecer o genótipo do vírus circulante, detectar variações genômicas, diferenciar um caso autóctone do importado e diferenciar o vírus selvagem do vacinal (WHO, 2007; Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009; WHO, 2012).

Recentemente, amostras alternativas, tais como amostras de sangue seco em papel de filtro (são amostras de sangue coletadas em papel de filtro) e fluidos orais, têm sido utilizadas no diagnóstico para a detecção de anticorpos. Os fluídos orais também podem ser usados para detectar o RNA viral e a sua utilização é cada vez mais comum, pois as amostras podem ser obtidas com segurança e de forma não invasiva, sem os riscos associados com a coleta de sangue, além de melhorar a adesão do paciente, visto que o procedimento é simples e indolor (Bellini & Helfand, 2003).

1.10.1. Testes sorológicos

O diagnóstico sorológico do sarampo consiste na demonstração de anticorpos da classe IgM específicos para o vírus do sarampo no soro ou saliva. Para verificar infecção ativa ou recente, usam-se amostras de soro pareadas da fase aguda e convalescente, no sentido de demonstrar a elevação do IgG entre as duas fases. Anticorpo IgM aparecem ao mesmo tempo que o exantema, e pode ser detectado por 3 dias e até 4 semanas após o início do exantema na maioria dos indivíduos. Picos no título de IgG específico para sarampo aparecem cerca de duas semanas após o início do exantema e aumenta gradualmente em avidéz (Bellini & Helfand, 2003; WHO, 2007; Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009).

O diagnóstico sorológico do sarampo é em geral realizado através de ensaios imunoenzimático (EIE), porém, outros testes podem ser usados, como os testes de inibição da hemaglutinação (HI), neutralização por redução em placa (PRNT), inibição da hemolisina (HLI), fixação de complemento (CF)(Bellini & Helfand, 2003). Os testes de HI e PRNT medem os níveis de anticorpos contra duas glicoproteínas do vírus do sarampo, hemaglutinina e proteína de fusão. As principais limitações do teste de HI é a

exigência de hemácias sensíveis de macacos, a dificuldade de produzir o antígeno suficiente para um grande número de testes, e a possível presença no soro de inibidores inespecíficos da hemaglutinina. O PRNT é um método padronizado, padrão ouro e é usado para avaliar os demais testes, e é mais sensível do que HI ou EIE, e fornece a melhor correlação de proteção contra a infecção (Duvdevani *et al.*, 1996; Bellini & Helfand, 2003).

O método sorológico recomendado pela OMS para confirmação de casos de sarampo diagnosticado clinicamente é a detecção de IgM por EIE. O EIE/ELISA é o teste mais amplamente utilizado por sua objetividade na interpretação dos resultados. O EIE apresenta uma grande vantagem, pois somente uma amostra de soro do paciente é necessária para se obter o resultado, estão disponíveis em kits comerciais, exibe uma alta especificidade e sensibilidade, podendo ser realizados com o mínimo de treinamento. Estes testes também têm a capacidade detectar IgM, assim como respostas IgG, e portanto, têm particular importância no diagnóstico, bem como nos programas de controle do sarampo (Bellini & Helfand, 2003; WHO, 2007).

O teste detecção de IgM por EIE tem sido positivo no primeiro dia do aparecimento do exantema, no entanto nas primeiras 72 horas após o exantema 20% dos testes para IgM podem dar um resultado falso-negativo, e os testes são mais sensíveis entre o dia 4 e 28 após o aparecimento do exantema (Helfand *et al.* 1999; WHO, 2007).

1.10.2. Isolamento viral e detecção do RNA viral

A disponibilidade de linhagens celulares sensíveis para o isolamento do vírus do sarampo partir de amostras clínicas e o estabelecimento na rotina do RT-PCR (Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase), bem como as técnicas de sequenciamento têm permitido a caracterização genética rápida de um grande número de linhagens do vírus do sarampo, representando uma ferramenta valiosa para a vigilância epidemiológica do sarampo (WHO, 2007).

A falta de linhagens celulares sensíveis para o crescimento eficiente do vírus do sarampo faz com que o isolamento viral em cultura de células seja de difícil execução. O resultado depende do tempo e da forma como as amostras clínicas são transportadas

para o laboratório e do período em que foram coletadas. Inicialmente a linhagem de células B linfoblastóides de sagüi, B95a, era a linhagem celular preferida para isolamento primário do vírus do sarampo. Estas células são até 10.000 vezes mais sensível para o isolamento do vírus do sarampo a partir de amostras clínicas do que outras linhagens de células comumente usadas. As células B95a são relativamente fáceis de manter em laboratório e o efeito citopático (CPE) da infecção por sarampo é facilmente observado. No entanto, esta linhagem celular está infectada com vírus Epstein-Barr, e isso representa um risco para os técnicos dos laboratórios. Essas células devem ser tratadas como material infeccioso em todos os momentos. Por esta razão B95a não é mais a linhagem celular preferida para o isolamento do vírus do sarampo em laboratórios de referência (Kobune *et al.*, 1990; WHO, 2007).

A Vero/SLAM, foi recentemente avaliada. Estas são células Vero, que são transfectadas com um plasmídeo, SLAM (molécula de sinalização da ativação do linfócito, também conhecido como CD150), uma glicoproteína de membrana recentemente descoberto expressa em algumas células T e B, que é um receptor celular para o vírus do sarampo (Tatsuo *et al.*, 2000). A sensibilidade das células Vero / SLAM para isolamento do vírus do sarampo é equivalente ao das células B95a. A vantagem das células Vero/SLAM é que elas não estão infectadas com vírus adventícios e, portanto, apresentam menos risco do que as células biológicas B95a (Kouomou & Wild, 2002). A atual desvantagem das células Vero/SLAM é que elas exigem meio de cultura contendo Geneticina para reter a expressão SLAM. O efeito citopático (EPC) desenvolve geralmente entre 48 horas e 15 dias, e consistem em um sincício amplo ou de uma forma estrelada, sendo que ambos podem revelar corpos de inclusão nuclear e citoplasmática (WHO, 2007; Keniscope *et al.*, 2009).

O vírus do sarampo pode ser detectado por RT-PCR usando iniciadores específicos para amplificação do gene N (região variável COOH terminal) e/ou H (completo) a partir de uma ampla variedade de amostras de RNA, extraídos do soro, aspirado nasofaríngeo e células no sedimento urinário. Amostras de tecidos, incluindo pulmão, rim, pele e cérebro também são usados para o teste de RT-PCR após o tratamento adequado e extração de ácidos nucleicos. As melhores amostras clínicas são de exsudados da faringe e a urina, uma vez que o genoma viral é apenas detectável no soro por PCR num

tempo muito curto, e o rendimento é muito baixo (Jin *et al.*, 1996; WHO, 2007; Rota *et al.*, 2009; WHO, 2012).

1.11. Dados epidemiológicos

A epidemiologia do sarampo no mundo pode ser dividida em três situações: 1) países de alta renda, onde a transmissão do sarampo foi interrompida através da vacinação em massa, e o estado nutricional das crianças é geralmente bom; 2) países de renda média, onde a vacinação em massa contra o sarampo é generalizada e estado nutricional das crianças é geralmente bom, mas ocorrem surtos ocasionais da doença; e 3) os países de baixa renda onde a cobertura vacinal contra o sarampo ainda é insuficiente, o sarampo é endêmico, e a deficiência de vitamina A é um problema de saúde pública. A primeira situação inclui a América do Norte, onde o número de casos de sarampo é bastante reduzido, e a cegueira por sarampo é quase desconhecida. Surtos de sarampo ocorrem ocasionalmente aqui entre as crianças mais velhas e, adultos que não foram imunizados ou que tiveram falha primária da vacina (Hussey, 2001). Na segunda situação, como na América Latina, a interrupção da transmissão do sarampo ocorreu, mas alguns países da região têm surtos periódicos de sarampo (Oliveira *et al.*, 2002).

Na terceira situação, o que inclui a maior parte da África subsaariana e partes do sul e sudeste da Ásia, o sarampo é endêmico e epidemias periódicas são associadas com uma proporção relativamente elevada de crianças com pneumonia, diarreia e complicações oculares como úlceras de córnea e ceratomalácia. Estima-se que cerca 85% de todas as crianças cegas no mundo são encontrados nessas regiões (Gilbert, 1998).

O sarampo é uma doença exantemática viral, altamente contagiosa, e podem ocorrer epidemias em populações com menos do que 10% de indivíduos susceptíveis (Gay, 2004). O homem é o único hospedeiro natural, não existe nenhum reservatório animal, embora macacos do velho mundo possam ser infectados experimentalmente (Rall, 2003). Antes do desenvolvimento e do uso difundido das vacinas contra sarampo a estimativa anual de mortes causadas por esta doença era de 5-8 milhões por ano (Moss & Griffin, 2006). Em 1980, antes da vacinação em massa, o sarampo causou uma estimativa de 2.6 milhões de mortes por ano (WHO, 2012).

De 2001 a 2011, mais de um bilhão de crianças dos nove meses aos 14 anos de idade que vivem em países de alto risco foram vacinadas contra a doença. Com as intensas atividades de imunização, as mortes por sarampo reduziram a 74%, de um total de 535.300 em 2000 para 139.300 em 2010 (WHO, 2012). Embora a incidência do sarampo tenha diminuindo, a doença continua a atingir vários países em desenvolvimento, particularmente em partes da África e Ásia. Por ano mais de 20 milhões de pessoas são afetadas pelo sarampo a cada ano. E a grande maioria (mais de 95%) das mortes por sarampo ocorre em países com baixa renda per capita e infraestruturas de saúde precárias (WHO, 2012).

O vírus do sarampo possui características favoráveis para à sua eliminação, tais como, ter o homem como único hospedeiro, ser monotípico e facilmente diagnosticável após o aparecimento do exantema (Moss & Griffin, 2006). Entretanto as dificuldades com o controle da doença devem-se em parte, ao fato de o vírus ser altamente infeccioso, espalha-se facilmente pelos indivíduos susceptíveis e também as dificuldades em atingir altas coberturas vacinais (95%). Em 2010, cerca de 85% das crianças em todo mundo receberam uma dose da vacina contra sarampo nos primeiros dias de vida fornecida pelos serviços de rotina em saúde, um aumento em relação aos 72% registrados em 2000 (WHO, 2012). Os recém-nascidos torna-se susceptíveis a infecção quando passivamente perde os anticorpos maternos adquiridos (Caceres *et al.*, 2000).

Quando endêmico, a incidência do sarampo tem um padrão temporal típico caracterizado pelas epidemias sazonais anuais, sobrepostas em longos ciclos epidêmicos de 2-5 anos. Esses ciclos resultam da acumulação de indivíduos susceptíveis entre sucessivas coortes de recém-nascidos e o declínio subsequente no número de indivíduos susceptíveis após um surto. Em regiões de clima temperado, os surtos de sarampo anuais tipicamente ocorrem no inverno e início da primavera. Esses surtos sazonais resultam em parte da fácil transmissão em lugares com um grande aglomerados de pessoas susceptíveis a doença (exemplo, em escolas) (Fine & Clarkson, 1982) e aos fatores ambientais que favorecem a viabilidade e transmissão do vírus. Nos trópicos, os surtos têm a variabilidade associada com as épocas chuvosas, que combinadas com altas taxas de nascimento resultam em grandes surtos altamente irregulares (Ferrari *et al.*, 2008).

1.11.1. Distribuição Mundial do sarampo

Em 2001, a Iniciativa do Sarampo (Measles Initiative), uma parceria da Cruz Vermelha nas Américas Cross (America Red Cross), Fundação das Nações Unidas (United Nations Foundation), Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (United States Centers for Disease Control and Prevention - CDC), a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Fundação das Nações Unidas para a Infância- UNICEF (The United Nations Children's Fund) desenvolveram o Plano estratégico Global para o Sarampo com o objetivo de reduzir as mortes por essa enfermidade. Desde o seu lançamento, a *Measles Initiative* tem apoiado a vacinação de mais de 700 milhões de crianças em 60 países. Como resultado as mortes de crianças por sarampo tem diminuindo, de 78% a partir da estimativa de 733.000 em 2000 para 164.000 em 2008. Todas as regiões da OMS exceto a região Sudeste da Ásia não atingiu as metas das Nações Unidas para a redução da mortalidade por sarampo para 90% entre 2000 e 2010. Em 2008 o maior número de mortes por sarampo (77%) ocorreu na região Sudeste da Ásia (WHO, 2012). A Figura 1-7 ilustra os casos de sarampo distribuídos por mês e por região da OMS no período de 2008-2012.

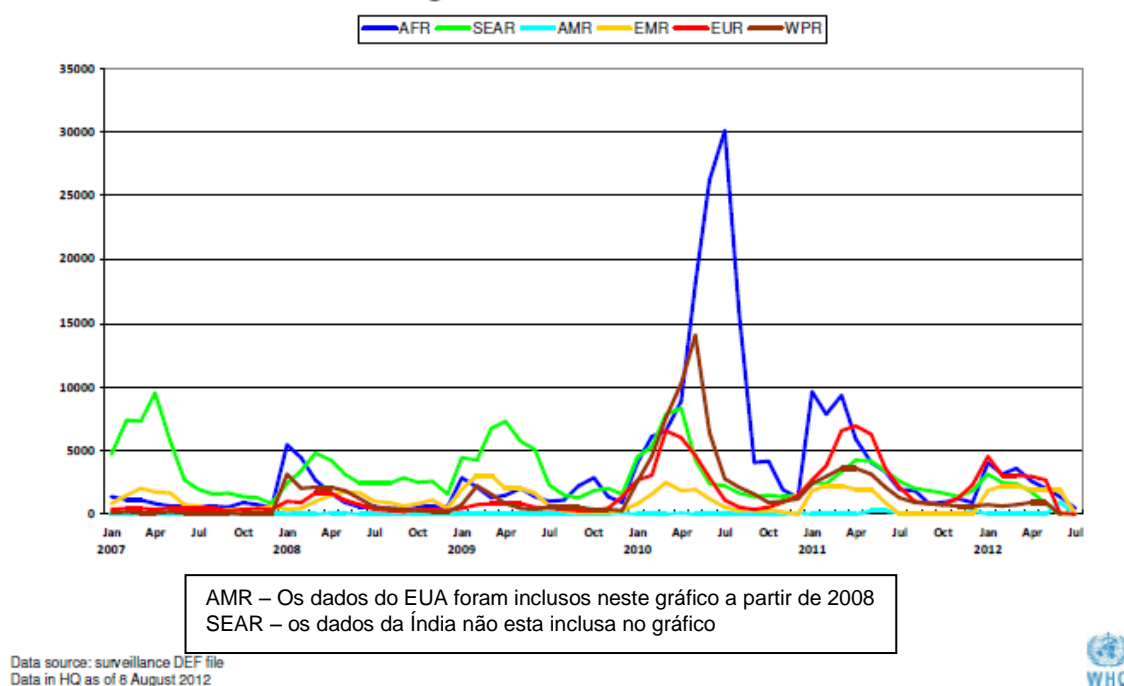


Figura 1- 7: Distribuição dos casos de sarampo por mês e por regiões da OMS, 2008-2012
Fonte: (WHO, 2012)

Para fazer qualquer incursão na transmissão de doenças altamente contagiosas, tais como o sarampo, são necessários altos níveis de cobertura vacinal, acima de 90%. A cobertura vacinal nas regiões monitoradas pela OMS da África e Sudeste da Ásia em 2008 permanece abaixo de 80%. Durante o período de 2000-2008 as mortes devido ao sarampo diminuíram para 569 000, representando 35.6% do total de mortes em crianças no mundo (WHO, 2011)

O quarto objetivo do Desenvolvimento do Milênio (ODM 4) visa reduzir a taxa da mortalidade de menores de cinco anos entre 1990 e 2015. Reconhecendo o potencial da vacinação contra o sarampo de reduzir a mortalidade infantil, e dado que a cobertura vacinal contra sarampo pode ser considerada um marcador de avaliação dos serviços de saúde infantil, esta foi selecionada com um indicador dos progressos para alcançar o ODM4 (WHO, 2012).

Inúmeras evidências têm demonstrado o benefício de garantir acesso universal a vacina contra sarampo e rubéola. Mundialmente, cerca de 535.300 crianças morreram por sarampo em 2000. Até 2010, o esforço global para melhorar a cobertura vacinal resultou em uma redução de 74% nas mortes. Todos esses esforços, apoiados pela *Measles e Rubella Initiative (MR Initiative)*, contribuíram para a redução global de 23% das mortes em menores de cinco anos, entre 1990 e 2008, e está impulsionando os progressos no cumprimento da ODM4 (WHO, 2012).

Em Abril de 2012, a *MR Initiative* lançou o novo Plano Estratégico Global para Sarampo e Rubéola que cobre o período de 2012 a 2020. O Plano inclui novas metas mundiais para 2015 e 2020 (WHO, 2012):

- Até o fim de 2015, redução mundial das mortes por sarampo em até pelo menos 95% comparando com os níveis de 2000. E alcançar as metas regionais de eliminação do sarampo e rubéola/Síndrome da Rubéola congênita (SRC).
- Até o fim de 2020, alcançar a eliminação do sarampo e da rubéola em pelo menos cinco regiões controladas pela OMS.

1.11.2. Distribuição dos genótipos do vírus do sarampo no Mundo

Em geral, têm sido descritos três padrões de distribuição dos genótipos do vírus do sarampo (Rota *et al.*, 2011):

- Em países que ainda têm transmissão endêmica de sarampo, a maioria dos casos são causados por um ou vários genótipos endêmicos que estão geograficamente distribuídos. Nestes casos várias linhagens co-circulam juntamente com o genótipo ou genótipos endêmicos presentes nessa área.
- Em países que já eliminaram o sarampo, o pequeno número de casos detectados são causados por uma série de diferentes genótipos que refletem diversas fontes do vírus importado e sugerem a falta de transmissão sustentada por genótipo endêmicos ou genótipos selvagens.
- O terceiro padrão ocorre em países ou regiões que obtiveram um controle muito bom de sarampo, mas estão experimentando um aumento no número de indivíduos susceptíveis por causa da incapacidade de manter uma alta taxa de cobertura vacinal. Nesta situação, uma reintrodução do sarampo geralmente pode resultar em surtos associados a um único genótipo do vírus, com sequências quase idênticas. Em países que estão próximos da eliminação do sarampo, a introdução de vírus sarampo pode resultar no surgimento de pequenos a moderados surtos que podem contribuir para o estabelecimento e manutenção das cadeias internacionais de transmissão.

A combinação da caracterização molecular e a classificação epidemiológica do caso índice fornecem um meio muito sensível para descrever as vias de transmissão do sarampo. A vigilância epidemiológica é especialmente vantajosa quando é possível monitorar os genótipos virais em um determinado país ou região ao longo do tempo, porque essa informação pode ajudar a documentar a interrupção da transmissão endêmica do sarampo (Rota *et al.*, 1996; Mulders *et al.*, 2001; Rota & Bellini, 2003; Riddell *et al.*, 2005). Evidência da ausência de um ou mais genótipos endêmicos é um dos critérios para verificação da eliminação do sarampo em um país ou região (genótipo endêmico são definidos como um ou mais genótipos associados à transmissão endêmica do sarampo numa determinada região) (Rota *et al.*, 2011). A Figura 1-8 ilustra a distribuição mundial dos genótipos do vírus do sarampo em 2011, onde podemos

observar que o genótipo B3 encontra-se amplamente distribuído pela África. E na Europa, o genótipo mais predominante foi o D4.

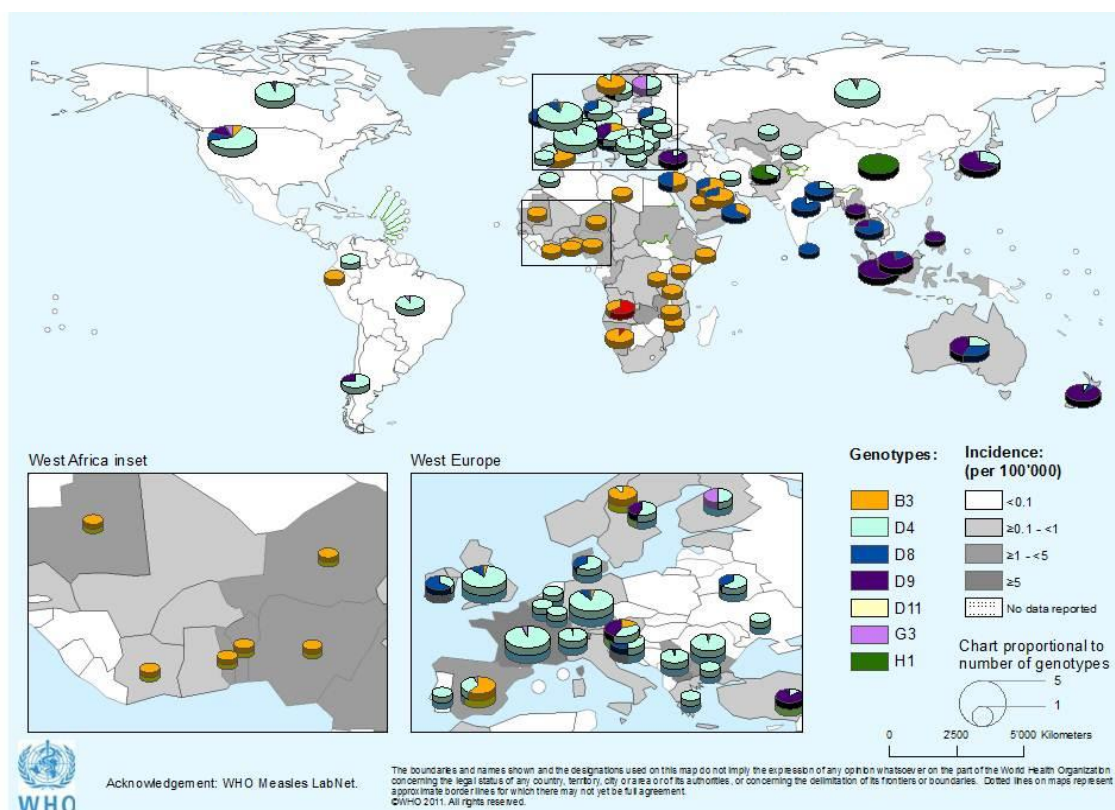


Figura 1- 8: Distribuição dos genótipos do sarampo em 2011.

Fonte: Measles Surveillance data, 2012 (WHO, 2012).

O genótipo A era o genótipo mais frequente antes da vacinação, Este genótipo continuou circulando até a década de 90, tendo sido isolado em casos agudos de sarampo nos Estados Unidos (Rota *et al.*, 1998), Reino Unido (Outlaw & Pringle, 1995), Sul da América (Bellini & Rota, 1998), Rússia (Santibanez *et al.*, 1999), China (Xu *et al.*, 1998), Finlândia (Bellini & Rota, 1998), mas tendo mostrado várias substituições de nucleotídeos que os permitiu distinguir daquele genótipo característico das vacinas (Rima *et al.*, 1995).

O grupo B contém os genótipos B1, B2, dois B3 e são endêmicos na região central e ocidental da África Subsaariana. O B1 atualmente considerado como inativo. O genótipo B2 foi detectado em Angola (2003), África do Sul (2002) e, na República Democrática do Congo (2005) (Smit *et al.*, 2005), principalmente em associação com casos e importação de Angola e na República Central Africana (Smit *et al.*, 2005;

Gouandjika-Vasilache *et al.*, 2006), e, em 2004, durante um surto em Kinshasa (República Democrática do Congo) houve uma mudança repentina do genótipo B3 para o B2 (Kremer *et al.*, 2010). Um único caso de genótipo B2 foi encontrado na Namíbia em 2010, o que indica que o genótipo ainda está circulando (Rota *et al.* 2011). E em 2011, casos de sarampo do genótipo B2 foram identificados em Angola e Namíbia (Figura 1-8). O genótipo B3 foi dividido em dois grupos (Hanses *et al.*, 1999). O vírus do Genótipo B3, *cluster 1*, foi isolado no Camarões, Gana, e Nigéria e, também no Quênia e na Tanzânia, sugerindo que os vírus do genótipo B3 estão amplamente distribuídos por toda a África (Hanses *et al.*, 1999; El Mubarak *et al.*, 2002). A circulação do genótipo B3 *cluster 2* parece ser mais limitada a África Ocidental (Kouomou *et al.*, 2002; Mulders *et al.*, 2003).

O genótipo C1 está considerado inativo. A Transmissão do genótipo C2 que era inicialmente endêmico em vários países da Europa, não tem causado surtos desde 2004, e não tendo sido detectado na Europa no período de 2007-2009 (Rota *et al.*, 2011).

O grupo D contém 10 genótipos amplamente distribuídos pelo mundo. O genótipo D1 foi endêmico na Austrália na era pré-vacinação e foi também detectado no Reino Unido na era antes da vacinação, mas não têm sido detectado desde 1986, atualmente considerado como inativo. Os D2, D3 e D10 anteriormente endêmicos na África e Ásia (Truong *et al.*, 1999; Muwonge *et al.*, 2005) não têm sido detectados desde 2006 (Baliraine *et al.*, 2011)

O genótipo D4 encontra-se amplamente distribuído e associado com múltiplos surtos no Subcontinente Indiano, na África Oriental e Austral, num surto no Canadá 1989, e depois em 1997 na África do sul sendo predominante nesta área. O D4 tem sido associado a importações nos EUA, e foi introduzido na Europa em 2007, resultando em surtos em vários países da Europa (200-2007) (Kreis *et al.*, 1997; Bellini & Rota, 1998), e em países Asiáticos como a Síria e o Irã em 2003 (Djebbi *et al.*, 2005) e nas ilhas do oceano Índico (Waku-Kouomou *et al.*, 2007). Este genótipo tem sido amplamente associado a vários surtos e casos esporádicos em vários países do mundo.

Em 2003, Mbugua e cols descreveram presença de quatro grupos distintos (Subgrupos) de vírus do sarampo genótipo D4, e de forma e diferencia-los foi usada a designação

"like", tendo sido designado como "Montreal-like", "Johannesburg-like", "India-like", e "Ethiopia-like" (Mbugua *et al.*, 2003). Esta designação "like" não encontra-se mais em uso. A investigação das variações entre os subgrupos de um genótipo particular é importante para diferenciar os surtos que ocorrem em áreas geograficamente próximas e no que diz respeito a uma melhor determinação das vias de transmissão. Em 2005 a 2006, 4 sub-genótipos do genótipo D4 foram identificados na Europa (Mosquera *et al.*, 2010). Várias variantes do genótipo D4 têm sido identificadas e associadas aos recentes surtos na Europa e casos importados na América, onde pode se observar a circulação de diversas variantes genótipo D4 sequência "Enfield" (WHO, 2011; WHO, 2012).

O genótipo D5 foi detectado em pequenos surtos nas Maldivas em 2005 e foi introduzido na Suíça, presumivelmente a partir da Tailândia, no final de 2006. A partir dos surtos subsequentes (Richard & Masserey, 2009), o vírus espalhou-se para a Austrália, França, Dinamarca, e outros países (Schmid *et al.*, 2008; Waku-Kouomou *et al.*, 2010).

O genótipo D6 circulava em muitos países no Oeste da Europa, e foi associado a múltiplas importações para os EUA. O genótipo D6 espalhou-se pela América do sul, e foi responsável pela epidemia no Brasil em 1997 (Siqueira *et al.*, 2001). Na Europa o Genótipo D6 foi detectado até 2007 (Shulga *et al.*, 2009).

O genótipo D7 parecia ser endêmico na Alemanha e Espanha (Chibo *et al.*, 2000), mas não mais circular na Europa onde já não é identificado desde 2004. Tendo sido detectado em alguns casos esporádicos na Índia (Vaidya *et al.*, 2008).

O genótipo D8 foi primeiramente isolado no Reino Unido em 1994 (Truong *et al.*, 1999), este ainda co-circulou com o genótipo D4 no Subcontinente Indiano (Wairagkar *et al.*, 2002) e Etiópia (Nigatu *et al.*, 2001). No período de 2007-2009 foram associados a casos no Canadá, Argentina, Estados Unidos, e detectado em casos na Índia, Bangladesh e, Marrocos (Rota *et al.*, 2011). Em 2011 o genótipo D8 foi maioritariamente detectado na Europa (Figura 1-8).

O genótipo D9 foi inicialmente isolado na Indonésia em 1999, e foi responsável por surtos na Venezuela, e Colômbia durante o período de 2001-2003 (Rota & Bellini,

2003; Riddell *et al.*, 2005). No período de 2007-2009, o genótipo D9 foi detectado na Camboja, Malásia, Filipinas, Singapura, Indonésia, Tailândia, Mianmar (Rota *et al.*, 2011). E em 2011 foi detectado maioritariamente em várias regiões da Ásia (Figura 1-9). O genótipo D10 foi descrito pela primeira vez num surto no Uganda no período de 2000-2002 (Muwonge *et al.*, 2005). E mais recentemente o genótipo D11 detectado durante um surto na província de Yunnan na China (Zhang *et al.*, 2010; WHO, 2012)

O grupo G consiste em três genótipos, dos quais o G1, que não tem sido detectado desde 1983, e ou outros dois (G2 e G3) que foram associados com as cadeias de transmissão e importações a partir da Indonésia e Malásia (Rota *et al.*, 2000). E foi considerado endêmico nas Filipinas e na Malásia no período de 2007-2009 (Rota *et al.*, 2011).

O grupo H, contem dois genótipos H1 e H2 que predominaram na Ásia. O genótipo H1 continua sendo uma cepa indígena na China. As sequências do genótipo H1 chinês têm sido divididas em três *cluster* H1a, H1b, H1c (Zhang *et al.*, 2007).

1.11.3. Sarampo na Região das Américas

Embora os países das Américas tenham introduzido a vacina contra o sarampo na década de 1960, foi somente em 1977 com o estabelecimento do Programa Ampliado de Imunizações (EPI) nas Américas, por uma resolução do Conselho Diretor da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), que a região definiu como meta a redução da morbidade e mortalidade por sarampo e outras cinco doenças preveníveis por vacina, fornecendo serviços de imunização a todas as crianças menores de um ano (Olive *et al.*, 1995).

Antes do estabelecimento da EPI, de 1971-1977, cerca de 28 países das Américas haviam relatado uma media de 258 634 casos de sarampo por ano e períodos interepidêmicos de 2-3 anos (PAHO, 1979). Com o uso generalizado da vacina contra o sarampo, observou se em vários países, incluindo Canadá, partes do Brasil, Chile, Costa Rica, Cuba, México e Estados Unidos, um prolongamento dos períodos entre as epidemias e também uma redução drástica nos casos de sarampo (PAHO, 1983).

A América Latina foi à pioneira na implementação das novas estratégias para eliminação do sarampo, que incluem os três componentes de vacinação: campanhas de vacinação indiscriminada (catch-up), entre crianças de 1 a 14 anos, independentemente da história de vacinação ou relato de infecção pelo sarampo; manutenção da vacinação de rotina (Keep-up), por meio dos serviços de saúde pública em pelo menos 95% de crianças de 12 a 15 meses; campanhas de seguimento periódicas (Quadros, *et al.*, 1999). As primeiras campanhas de vacinação indiscriminada (catch-up) foram implantadas em Cuba em 1887. Brasil e Chile seguiram com a campanha de vacinação indiscriminada (catch-up) em 1992. Os esforços dos países pioneiros mostrou sucesso na interrupção da transmissão viral (Olive *et al.*, 1995).

No período de 1988-1991, o sarampo ressurgiu em vários Países das Américas (Santos *et al.*, 2004; Strebel *et al.*, 2004). Para alcançar a erradicação do sarampo nas Américas, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), desenvolveu durante a Conferência Sanitária Pan-Americana em 1994, as estratégias de vacinação tendo por base a epidemiologia da doença antes e após a introdução a utilização da vacina em 1963-1970 (prolongamento dos períodos entre as epidemias e deslocamento da faixa etária) e a bem sucedida erradicação regional da poliomielite (de Quadros *et al.*, 1996; Castillo-Solorzano & Ruiz-Matus, 2009).

No final de 2002, todos os países da América, exceto os Estados Unidos, conduziram campanhas de vacinação indiscriminada (catch-up), e muitos as complementaram com campanhas de seguimento (follow-up), oferecendo uma segunda oportunidade para as crianças receberem sua primeira dose da vacina contra o sarampo, enquanto que as que receberam uma dose prévia se beneficiariam com um reforço. Se em 1990 mais de 240 mil casos de sarampo foram relatados na Região das Américas, em 1996 foi constatada uma redução de 99% em relação aos níveis anteriores (Cutts *et al.*, 1999).

Foi relatado o ressurgimento do sarampo, em 1997, no estado brasileiro de São Paulo e entre 2001-2002 na Venezuela e Colômbia (de Quadros *et al.*, 2008), e 11 casos registrados em 2009 registrados na Argentina, Estados Unidos, Canadá, todos foram relacionados a casos importados. Estes dados indicam os perigos da não execução integral das estratégias de eliminação. A figura 1-9 ilustra a redução dos casos de

sarampo confirmados nas Américas e também as estratégias adotadas para atingir a interrupção da transmissão do vírus do sarampo na região.

Desde a interrupção da transmissão endêmica do sarampo nas Américas, em 2002, as importações registradas em países da OPAS não tem gerado epidemias. Na maioria dos casos os surtos de sarampo têm sido rapidamente controlados. O extraordinário progresso na região das Américas na interrupção da transmissão autóctone indica que a transmissão pode ser interrompida e assim ser mantida por longo período de tempo, isto se forem implementadas as estratégias adotadas pela OPAS. Os dados da vigilância do sarampo, combinados com os resultados dos estudos de caracterização molecular, indicam que os países das Américas estão continuamente expostos ao vírus do sarampo proveniente de outras regiões do mundo onde a doença continua endêmica. Desde 2003, a maioria dos casos de sarampo registrados nas Américas tem sido relacionados a importações da Europa (de Quadros *et al.*, 2008).

Dos 524 casos confirmados de sarampo relatados durante 2008-2010, 222 foram importações de sarampo e 302 estavam ligados à importação. A fonte dos casos importados foram identificadas apenas em 124 dos 222 casos, e 35% destes eram importações da Europa. Os grandes eventos internacionais, nomeadamente os Jogos de Inverno 2010 em Vancouver e a Copa do Mundo em 2010 na África do Sul, foram associados com um grande número de casos de sarampo relatados pelo Canadá, Argentina e Brasil em 2010 (Castillo-Solorzano *et al.*, 2011).

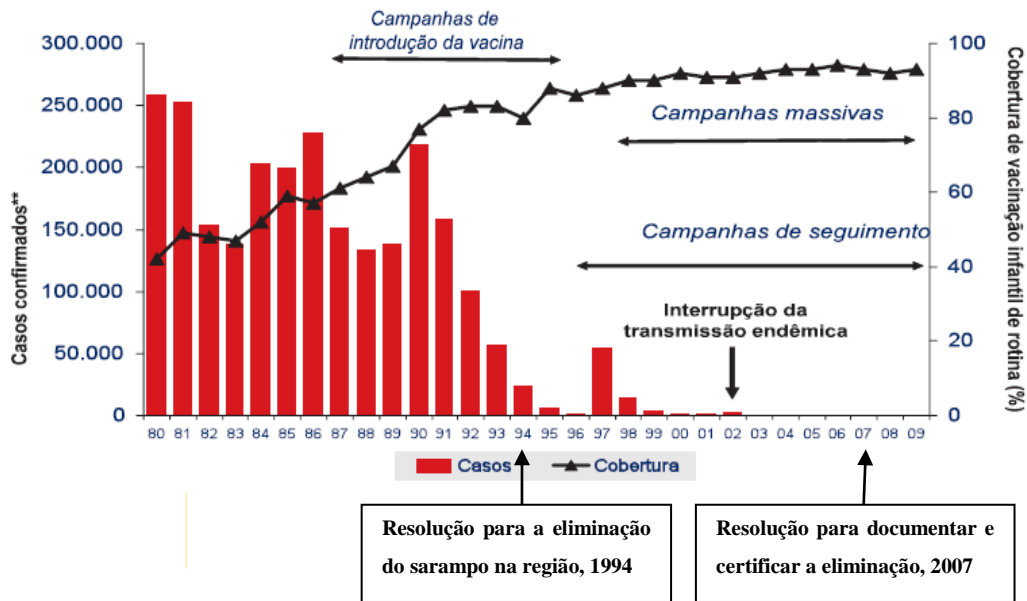


Figura 1- 9: Distribuição dos casos de sarampo e estratégias implementadas para o controle e eliminação do sarampo nas Américas, no período de 1980-2009

Adaptado de Castilho-Solarzano *et al.*, 2011(Castillo-Solorzano *et al.*, 2011)

O genótipo D6 foi considerado endêmico nas Américas, e associado com o surto de 1997 no Brasil e surtos subsequentes na Argentina, Bolívia, Haiti e República Dominicana (Rota *et al.*, 2009). A ausência de vírus D6 apesar da identificação de genótipos a partir de outras regiões suporta a eliminação do genótipo D6 das Américas (Hersh *et al.*, 2000). No período de 2001-2002, um surto de um genótipo previamente desconhecido, D9, foi pela primeira vez identificado na Venezuela e, mais tarde, na Colômbia. Investigações posteriores identificaram o genótipo - D9 sarampo na Indonésia, o que sugere que o genótipo D9 pode ter sido importado para a Venezuela a partir de um caso índice não identificado (Anon, 2003). Na Figura 1-10 podemos observar os diferentes genótipos que circularam nas Américas no período de 2001-2009.

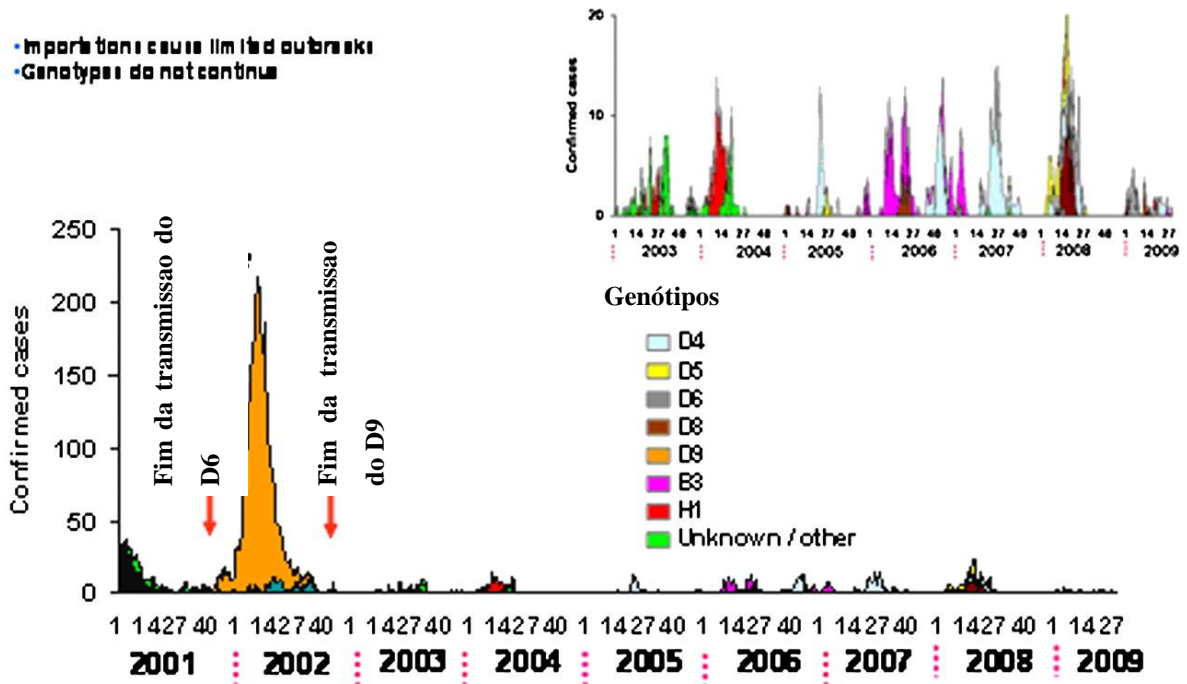


Figura 1- 10: Genótipos de sarampo identificados a partir de investigações de casos nas Américas, 2001-2009.

Adaptado de Castilho-Solorzano *et al.*, 2011(Castillo-Solorzano *et al.*, 2011)

1.11.4. Sarampo no Brasil

Em 1968, o sarampo passou a ser uma doença de notificação compulsória, justamente no ano em que foi registrado o maior número de casos notificados (129.942). Na década de 70 as epidemias chegaram a acometer 2-3 milhões de crianças. As informações sobre as coberturas vacinais em menores de um ano indicaram índices médios em torno de 65% entre 1980 e 1989. No Brasil, a vacina contra o sarampo foi, efetivamente implantada em todo país a partir de 1973, quando foi criado o Programa nacional de Imunizações (PNI). De 1973 a 1992 a recomendação era de aplicar-se uma única dose de vacina monovalente. Inicialmente, a idade mínima para receber a vacina era de oito meses. Em 1976, a idade mínima mudou para sete meses e em 1982, com base em um estudo de imunogenicidade, passou a ser de nove meses (Waldman & Camargo, 1996; Secretária de Vigilância em Saúde, 2010).

Até início dos anos 90, os mais atingidos eram os menores de 15 anos de idade e o país enfrentou cerca de nove epidemias, a cada dois anos em média, em decorrência,

principalmente, da incipiente cobertura de vacinação. De 1992 em diante, a aplicação de uma segunda dose de vacina de sarampo administrada dos 12 aos 15 meses foi recomendada para todo o território nacional. Até 1992, o País enfrentou dez grandes epidemias, sendo em média, uma a cada dois anos, e o vírus foi caracterizado como sendo do genótipo C2 (Secretária de Vigilância em Saúde, 2010).

Essa situação epidemiológica motivou o governo Brasileiro a implantar, em 1992, o Plano Nacional de Controle e Eliminação do Sarampo. O marco inicial do Plano de eliminação foi à realização da Campanha Nacional de Vacinação, durante a qual foram vacinadas mais de 46 milhões de crianças e adolescentes, na faixa etária de nove meses a 14 anos de idade, com cobertura vacinal de 96%. O impacto dessa campanha foi imediato, verificando-se a redução de 81% no número de casos notificados, que se prolongou até o ano de 1996 (Brasil, 2001a; Brasil, 2001b).

Apesar dos esforços realizados após a implementação do programa, em 1996, foram identificados três casos importados de sarampo em dois surtos nas regiões Sul e Sudeste do país. No ano seguinte, em 1997, ocorreu um surto de sarampo na cidade de São Paulo, a única unidade do Brasil que não implementou a campanha de seguimento (follow-up) programada para 1995. E o genótipo que circulou na epidemia de 1997 foi o D6 (Siqueira *et al.*, 2001). O surto, com cerca de 50.00 casos, provavelmente originado por um vírus do sarampo importado da Europa, propagou-se para outros estados brasileiros, e o genótipo D6 espalhou-se também para a Argentina, Chile, Caribe (Republica Dominicana) e ainda Bolívia, Uruguai e Haiti (Hersh *et al.*, 2000; de Quadros *et al.*, 2004).

Com o objetivo de fortalecer as estratégias necessárias à consolidação da meta de erradicação, em 1999, o Ministério da Saúde elaborou o Plano de Ação Emergencial, com a formação de um grupo tarefa nacional a fim de desencadear um conjunto de ações de vigilância epidemiológica, identificação de grupos de alto risco e treinamento de profissionais de saúde e controle em 27 estados da Federação (Brasil 2001b; Secretária de Vigilância em Saúde 2010) . A vacina tríplice viral (MMR – Measles, Rubella, Mumps) foi implementada gradualmente no Brasil, iniciando 1992 em São Paulo e finalizando em 2000 em todo o país (OPAS/OMS, 2001).

Em 2000, ocorreu o último surto de sarampo no Estado do Acre com 36 casos confirmados, o grupo de maior risco foi de menores de um ano de idade. No mesmo ano foi detectado, no estado do Mato Grosso do Sul, o último caso autóctone de sarampo no Brasil (OPS/OMS, 2001). A partir de 2002, foram confirmados apenas casos importados no Brasil, um caso em 2002, onde foi identificado o genótipo D5 (registrado em São Paulo importado da Japão) e dois em 2003, foi identificado o genótipo D4 registrado em Santa Catarina e importado da Alemanha. Sugerindo assim a interrupção autóctone do sarampo no Brasil (Prevots *et al.*, 2003).

Em julho de 2005 foram detectados novos casos de sarampo no Brasil, que resultaram na reintrodução do vírus, a partir de um esportista brasileiro, não vacinado, que se infectou durante um evento internacional nas ilhas Maldivas. O genótipo identificado foi o D5, cepa que circulava em países como o Japão, Tailândia e Camboja. Após a identificação do genótipo, houve um alerta geral com o desencadeamento de atividades intensivas de busca ativa de casos, durante o período de transmissibilidade da doença. (MS, 2010, Brasil, 2005).

Em 2006, foram confirmados 57 casos, no estado da Bahia onde foi identificado o genótipo D4, não foi possível estabelecer vínculo entre os casos. Embora nesse período tenham sido detectados estrangeiros na área, no entanto, nenhum dos casos relatou contacto com pessoas oriundas de outros países (Secretária de Vigilância em Saúde, 2010).

Entre 2007 e 2009, não foram registrados casos de sarampo no país, em 2010, três casos foram confirmados e o genótipo identificado foi o D4, vírus similar ao registrado e associado a surtos que estavam ocorrendo na Inglaterra, França Itália e Holanda. E através da caracterização genética foi possível demonstrar que se tratava de casos relacionados a um vírus importado (Secretária de Vigilância em Saúde, 2010). Ainda em 2010, no estado do Rio Grande do Sul, foram confirmados outros dois casos de sarampo no país, um caso foi classificado como caso importado e o outro, relacionado ao caso importado. A Figura 1-11 mostra graficamente a taxa de incidência do sarampo e as estratégias adotadas para controle no período de 1968-2011, no Brasil.

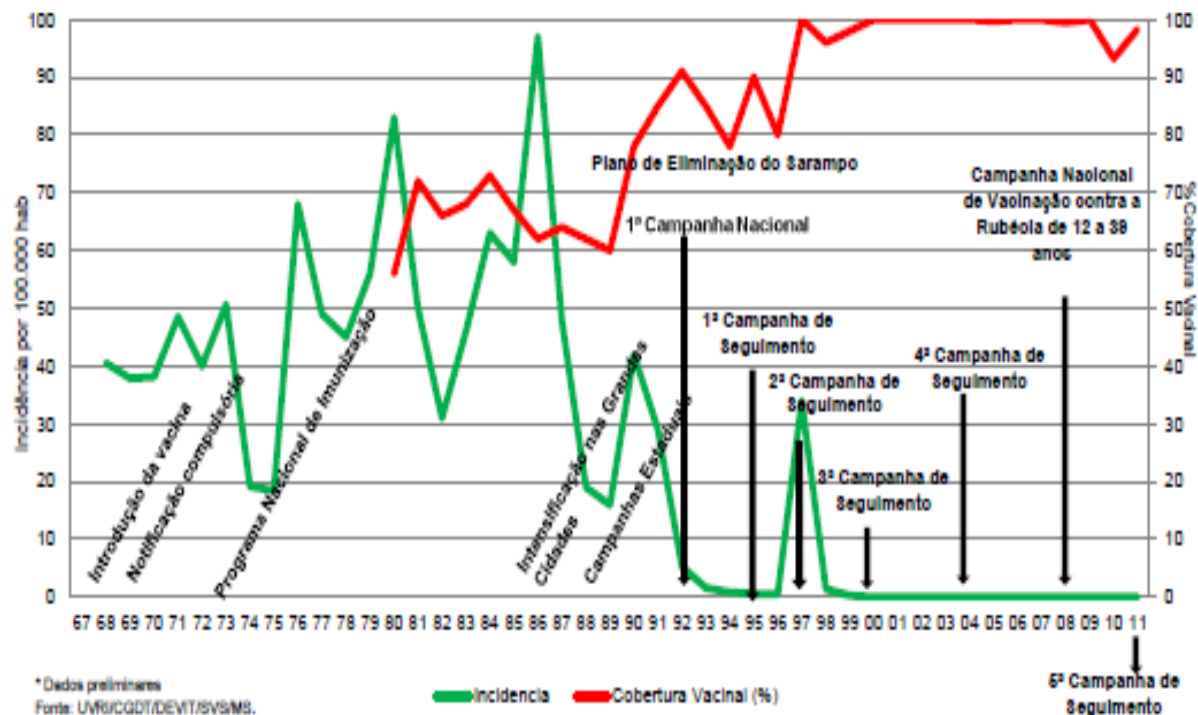


Figura 1- 11: Estratégias de controle e Incidência do Sarampo 1968-2011, Brasil.
Fonte: UVRI/CGDT/DEVIT/SVS/MS

Os casos de sarampo, em 2011, ocorreram nos estados de São Paulo, Santa Catarina, Bahia, Pará, Rio Grande do Sul, Paraíba, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Piauí, Minas Gerais e no Distrito Federal, a distribuição dos casos por faixa etária variou entre cinco meses e 43 anos. Os genótipos identificados foram o D4 e G3 (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011). A Figura 1.12 ilustra a distribuição por estado dos casos de sarampo detectados em 2011 no Brasil, onde podemos observar que o genótipo D4 do vírus do sarampo foi o mais detectado no Brasil no ano de 2011.

A detecção de casos importados e de casos relacionados, em países como o Brasil em que a interrupção da transmissão foi alcançada, e todos os países das Américas, constitui um evento que, embora não seja raro, aponta para a necessidade da manutenção da Vigilância epidemiológica ativa e alerta para novas e eventuais ocorrências (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010; Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011).

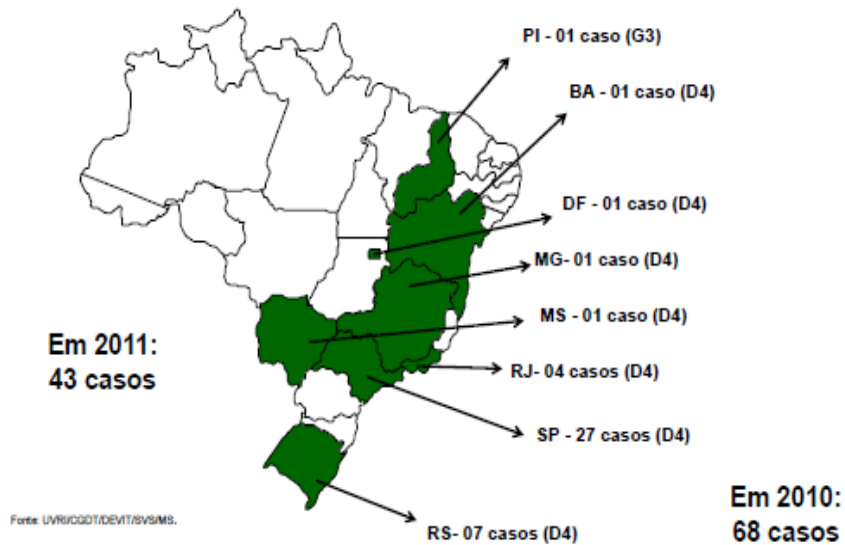


Figura 1- 12: Distribuição dos casos confirmados de sarampo por estado em 2011 no Brasil.
 Fonte: UVRI/CGDT/DEVIT/SVS/MS

1.12. Prevenção e Terapêutica

1.12.1. Vacina

As principais estratégias de saúde pública para a redução das mortes globais por sarampo são a vacinação de rotina, juntamente com as campanhas de imunização em massa contra o sarampo (WHO, 2012). A vacina contra o sarampo tem sido usada há mais de 40 anos, e representa uma das intervenções na área de saúde de maior sucesso e melhor custo-benefício, já realizadas. A vacina tem baixo custo de produção, induz altos índices de soroconversão e foi capaz de interromper a transmissão viral em extensas áreas geográficas, mostrando-se uma ferramenta crucial para a eliminação global da doença (Moss & Griffin, 2006).

Em 2010, cerca de 85% das crianças do mundo receberam uma dose da vacina contra sarampo no seu primeiro ano de vida, através dos serviços de saúde de rotina - um aumento em relação à 72% registrados em 2000. A OMS recomenda duas doses da vacina contra o sarampo para garantir a imunidade, sendo que cerca de 15% das crianças vacinadas não conseguem desenvolver imunidade a partir da primeira dose (WHO, 2012).

A dificuldade em se manter altos níveis de imunidade na população, por outro lado, resulta na acumulação de indivíduos susceptíveis, criando condições que favorecem a transmissão rápida de genótipos recentemente introduzidos (Riddell *et al.*, 2005).

A cepa viral Edmonston, da qual a maior parte das vacinas se derivou, foi desenvolvida após o isolamento em cultura de tecido obtido por Enders e Peebles em 1954. E esta cepa viral foi batizada de Edmonston que é o nome do paciente de quem o vírus foi isolado (Enders *et al.*, 1957). Esse vírus foi posteriormente submetido a múltiplas passagens em células amnióticas e de rim humano, adaptado a ovos e submetido a múltiplas passagens em células embrionárias de galinha para produzir a primeira linhagem vacinal. A Vacina Edmonston B foi a primeira vacina de sarampo a ser licenciada, em 1963. Apesar de estar associada a reações febris e exantema, seu emprego foi bastante disseminado até 1975 (Strebel *et al.*, 2004).

Entre 1963 e 1967, também se utilizou uma vacina derivada do isolado Edmonston, inativada pelo formol ou éter (Hall & Hall, 1979). Esta vacina causava poucos efeitos colaterais, mas sua utilização foi descontinuada por induzir imunidade de curta duração e, especialmente, por colocar seus usuários sob-risco de produzir um sarampo atípico, mais grave do que a infecção natural, quando exposto ao vírus. Os pacientes que desenvolviam este tipo de reação não produziam anticorpos contra a proteína F, mas uma grande quantidade de anticorpos contra a proteína H (Norrby, 1975; Norrby & Gollmar, 1975; Merz *et al.*, 1980; Annunziato *et al.*, 1982).

Diversas vacinas atenuadas contra o sarampo foram desenvolvidas no mundo e algumas delas estão em uso até os dias de hoje. Atualmente, a única cepa vacinal empregada nos Estados Unidos é a Moraten. A cepa vacinal Schwarz predomina na Europa; as cepas AIK-C, Schwarz f-88, CAM-70 e TD-97 são utilizadas no Japão e a principal cepa utilizada no leste europeu é a L-16 (Okuno *et al.*, 1971; Hirayama, 1983; Makino, 1983; Peradze & Smorodintsev, 1983; Clements *et al.*, 1988; Suzuki *et al.*, 1990; Parks *et al.*, 2001). As cepas vacinais atenuadas contra o sarampo podem ser utilizadas como vacinas monovalentes ou combinadas com outras vacinas virais, como caxumba e rubéola, constituindo a vacina tríplice viral ou MMR (*Measles, Mumps, Rubella*).

Atualmente a linhagem vacinal em uso no Brasil é a Schwarz, e o sequenciamento desta levou à conclusão que essa linhagem era semelhante à outra linhagem vacinal – a Moraten (Parks *et al.*, 2001). Estudo comparativo entre essas linhagens e a Edmonston levou à conclusão que todas apresentavam altas taxas de soroconversão – 98%. De forma interessante, a linhagem Schwarz causou mais febre entre os vacinados que a Moraten (diferença estatisticamente significativa). A linhagem Edmonston, por outro lado, não somente causou mais febre que as demais, mas também maior incidência de exantema cutâneo (Auwaerter *et al.*, 1999).

No Brasil, a vacinação contra o sarampo foi instituída no início da década de 1960 e incluída no Programa Nacional de Imunização (PNI), do Ministério da Saúde, em 1973. Inicialmente, era administrada em dose única aos oito meses de idade, em 1976 passou a ser aos sete meses e em 1982 tornou-se obrigatório aos nove meses, com reforço aos 15 meses. O esquema atual que utiliza a vacina tríplice viral- MMR administrada por via subcutânea em duas doses (a primeira aos 12 meses e a segunda aos quatro - seis anos), foi adotada em abril de 2004 (Secretária de Vigilância em Saúde, 2010).

Apesar de todas as vacinas disponíveis serem produzidas com vírus do genótipo A, os anticorpos gerados pelos indivíduos vacinados mostraram-se capazes de neutralizar o vírus do sarampo de diferentes genótipos (apresentando diferenças na eficiência da neutralização) (Riddell *et al.*, 2005; Finsterbusch *et al.*, 2009; CDC, 2012).

Na presença de diferentes genótipos endêmicos, os programas de vacinação com vacinas contra sarampo padronizadas têm sido bem sucedidas em todos os países onde foram realizadas de forma adequada (CDC, 2007; de Quadros *et al.*, 2008; CDC, 2009). A Soroconversão sub-ótima após a vacinação é provavelmente o resultado da cobertura inadequada; da má administração, transporte ou armazenamento da vacina; ou a idade dos destinatários da vacina (Hayden, 1979; Agocs *et al.* 1992; Cutts & Markowitz, 1994).

Vacinas contra o sarampo têm um excelente histórico de segurança, com apenas um pequeno número de eventos adversos relatados. Os eventos adversos mais comuns são febre e erupção cutânea começando 8-12 dias após a vacinação. A maioria destas reações é resolvida rapidamente, sem necessidade de intervenção clínica (Naniche *et al.*,

2000). A imunossupressão observada após a doença pôde, portanto, ser detectada após a vacinação (Auwaerter *et al.*, 1999), mas com menor intensidade (Okada *et al.*, 2001).

Apesar de infrequentes e controversas, outras doenças tem sido associadas à vacinação pelo sarampo, como o autismo (Bradstreet *et al.*, 2004). A associação MMR e autismo, por outro lado, não resistiu a estudos mais cuidadosos, que demonstraram não haver associação comprovada entre a vacina e o autismo (Peltola *et al.*, 1998; Madsen *et al.*, 2002).

As vacinas contra sarampo podem causar eventos adversos graves em indivíduos imunocomprometidos cujos sistemas imunológicos são incapazes de efetuar o *clearance* do vírus (Kaplan *et al.*, 1992; Moss *et al.*, 1999; Permar *et al.*, 2006). As crianças portadoras do vírus da imunodeficiência humana, mas que não demonstraram comprometimento do sistema imune podem ser seguramente vacinados com vacina contra o sarampo, e nestes é gerada alguma proteção contra vírus do tipo selvagem (Helfand *et al.*, 2008; Nair *et al.*, 2009).

Do ponto de vista neurológico, não há evidência de que as vacinas contra sarampo são responsáveis por casos de encefalomielite (SSPE) (Bellini *et al.*, 2005), porque apenas vírus do tipo selvagem foram detectados nestes casos.

1.12.2. Tratamento

O sarampo por ser uma doença aguda autolimitada, o tratamento é sintomático, isto é, visa ao alívio dos sintomas (Schneider-Schaulies & ter Meulen, 2009). Embora possam surgir complicações graves e até mortais por sarampo, estas geralmente encontram-se associada à desnutrição e às infecções secundárias, tornando evidente que os pilares do tratamento se baseiam no suporte nutricional, na re-hidratação com soluções oral e no tratamento das infecções secundárias com antibióticos adequados (Kabra *et al.*, 2008; WHO, 2012).

Confirmado o diagnóstico de sarampo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que os pacientes com desnutrição, e todas as crianças dos países em desenvolvimento devem receber suplementos de vitamina A (duas doses com intervalo da 24horas), uma vez que poderia ajudar a prevenir lesões oculares e cegueira,

induzidos pela destruição da córnea, além de reduzir o número de mortes por sarampo em 50% (Barclay *et al.*, 1987; WHO, 2012).

O tratamento com doses elevadas de vitamina A tem sido associado com a redução da morbidade e mortalidade do sarampo (Barclay *et al.*, 1987), mas este efeito é mais pronunciado em crianças menores de 2 anos de idade (D'Souza & D'Souza, 2002). A vitamina A seria fundamental na manutenção da integridade do tecido epitelial, tecido este que é infectado e danificado pelo vírus do sarampo. Isto sugeri que a deficiência de vitamina A esta associada á maior gravidade do sarampo, sendo o seu uso recomendado na fase aguda da doença (Esolen *et al.*, 1995; Villamor & Fawzi, 2005), levando a melhorar prognóstico (Hussey & Klein, 1990; Hussey & Klein, 1993).

Para profilaxia pós-exposição, a administração de imunoglobulinas específicas para sarampo (Ig) nos primeiros seis dias após a exposição inicial pode prevenir ou modificar a doença (Wyde, 1999). Este tratamento é recomendado para a proteção temporária de imunocomprometidos, mulheres grávidas e crianças menores de um ano de idade. No entanto, a terapia com Ig é relativamente cara, requer materiais estéreis e uma ininterrupta cadeia de frio, e em geral não é recomendada ou viável para o controlo de grandes surtos de sarampo (Plempner & Snyder, 2009).

Atualmente, não esta disponível nenhuma terapia antiviral específica para o tratamento do sarampo (Plempner & Snyder, 2009). A ribavirina (que está aprovado para o tratamento de algumas infecções por Paramixovírus) e as terapias com IFN α foram testadas clinicamente contra o vírus do sarampo, principalmente para o tratamento de pacientes que se apresentaram SSPE (Panencefalite Esclerosa Sub-aguda).

Apesar de em alguns estudos ter sido observado um efeito benéfico do IFN α (Lecciones *et al.*, 1998; Gascon, 2003), a maioria parte dos relatórios foi documentada uma recaída (Hara *et al.*, 2003; Miyazaki *et al.*, 2005; Hosoya, 2007) ou falta de eficácia (Gagnon & Bouchard, 2003; Oshiro *et al.*, 2004; Campbell *et al.*, 2005; del Toro-Riera *et al.*, 2006). O tratamento com altas doses de ribavirina, sozinho ou em combinação com IFN α , mostrou parecer ser mais eficaz contra o vírus do sarampo, do que o tratamento com IFN α sozinho (Fernandez *et al.*, 1986; Gururangan *et al.*, 1990; Stogner *et al.*, 1993; Forni *et al.*, 1994; Tomoda *et al.*, 2003; Hosoya, 2007; Pal *et al.*, 2011).

Embora alguns estudos tenham observado uma progressão gradual do sarampo, apesar da terapia antiviral (Hara *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2005) ou a falta de eficácia dos antivirais (del Toro-Riera *et al.*, 2006), esses estudos, no entanto, sugerem que os antivirais podem melhorar o quadro clínico e até evitar as complicações por sarampo, mesmo quando estas são administradas após o início dos sintomas clínicos (Plamper & Snyder, 2009).

Tem sido estudada uma variedade de diferentes estratégias antivirais para a inibição do vírus do sarampo, incluindo moléculas “*antisense*”, inibidores peptídicos, extratos naturais, análogos nucleosídicos e compostos de moléculas pequenas. Os inibidores “*antisense*” (Koschel *et al.*, 1995; Bell *et al.*, 1997), oligômeros morfolino peptídeo conjugado (Sleeman, Stein et al. 2009), apesar de eficazes contra o vírus do sarampo em modelos *in vitro*, estes têm alto custo de produção, estabilidade de armazenamento limitada.

Vários extratos naturais ou análogos sintéticos derivados de produtos naturais têm sido relatados, por possuir atividades antivirais contra o vírus do sarampo (Huang *et al.*, 1997; Wachsman *et al.*, 2002; Parker *et al.*, 2007). No entanto, muitas destas substâncias apresentaram atividade moderada em cultura de células, citotóxicos, inativos quando adicionados a células pós-exposição (Barnard, 2004; White *et al.*, 2007).

Uma classe recentemente desenvolvida de não-nucleosídeos, inibidores alvo específicos da atividade do complexo polimerase do vírus do sarampo, demonstrou uma atividade antiviral potente, na ordem nanomolar, quando testados contra um painel de isolados do vírus do sarampo do tipo selvagem, de genótipos atualmente endêmicos (White *et al.*, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando o processo de certificação da eliminação do sarampo no Brasil, quando os últimos casos autóctones confirmados datam de 2000 e, a existência de vários países enfrentando surtos esporádicos ou com transmissão endêmica, torna-se necessário

refinar as ações de vigilância frente ao surgimento de casos importados no intuito de evitar as reintroduções virais (Secretária de Vigilância em Saúde, 2010).

As investigações epidemiológicas e a caracterização molecular dos vírus detectados recentemente têm demonstrado que o genótipo D4 encontra-se amplamente distribuído em todos os continentes, e nos últimos anos tem sido relacionado a surtos e casos esporádicos, na Europa e nas Américas (CDC, 2011; Mosquera *et al.*, 2010). No Brasil, o genótipo D4 tem sido o mais frequentemente detectado em casos e surtos esporádicos de sarampo em diversos estados brasileiros. Neste sentido, a análise dos dados epidemiológicos e a caracterização molecular do gene N têm sugerido importações de vírus do sarampo, principalmente da Europa (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011). A genotipagem do vírus do sarampo é um importante instrumento da vigilância para documentar as cadeias de transmissão, discriminar entre vírus importados ou indígenas e monitorar os programas de eliminação (Rota *et al.* 2009; WHO, 2012). A análise da região C-terminal da nucleoproteína tem demonstrado uma diversidade limitada entre as cepas circulantes em regiões onde um genótipo específico é detectado por um longo período de tempo, exemplo do genótipo D4. Isto tem dificultado a determinação da origem dos vírus usando apenas essa região (WHO, 2012).

A caracterização genética do gene H do vírus do sarampo, que é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes e que codifica para a glicoproteína responsável pela ligação do vírus com a superfície das células, pode ajudar a determinar as cadeias de transmissão. No entanto, até ao momento, poucas sequências do gene H completo encontram-se disponíveis. Assim sendo, com o presente estudo, pretende-se analisar molecularmente o gene N e o gene H gerando assim conhecimento atualizado, como forma de subsidiar a vigilância do vírus do sarampo no Brasil no período de 2003 a 2012, atendendo recomendações da OMS.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar e caracterizar geneticamente amostras do vírus do sarampo do genótipo D4 detectados em diferentes estados brasileiros no período de 2003-2011

3.2. Objetivos específicos

- Realizar o isolamento vírus do sarampo do genótipo D4 em culturas de células Vero/SLAM.
- Estabelecer o protocolo de sequenciamento do gene H completo do vírus do sarampo.
- Realizar a caracterização molecular do gene H.
- Analisar filogeneticamente o gene N parcial e o gene H completo do vírus do sarampo.

4. METODOLOGIA E ESTRATÉGIAS

4.1. Casuística

O presente estudo é do tipo descritivo e foi conduzido no Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo (LVRS), na FIOCRZ, que atua como Centro de Referência Nacional (Ministério da Saúde) e Regional (Organização Mundial da Saúde) em Sarampo.

O LVRS recebe continuamente amostras clínicas (soro, sangue total, aspirado ou secreção de nasofaringe e urina) enviadas pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs) visando o esclarecimento e confirmação de casos suspeitos e surtos relacionados a quadros respiratórios e exantemáticos. No âmbito da vigilância do sarampo é realizado o diagnóstico sorológico por EIE onde são detectados IgM e IgG para sarampo, e ainda identificada a cepa do vírus circulante, por meio de caracterização genética de isolados ou amostras clínicas, através de reação de RT-PCR e/ou RT-PCR em tempo real seguido do sequenciamento.

Durante os surtos e casos esporádicos de 2003 a 2012, foram encaminhadas ao LVRS amostras clínicas provenientes de vários estados do Brasil como Santa Catarina (SC), Bahia (BA), Rio de Janeiro (RJ), Rio Grande do Sul (RS), Distrito Federal (DF), São Paulo (SP), (PA), (PE) Minas gerais (MG). Estas amostras foram submetidas a testes sorológicos (EIE) para detecção de anticorpos IgM e IgG, e à técnica de RT-PCR e/ou RT-PCR em tempo real do fragmento N do vírus do sarampo para posterior identificação do genótipo. O LVRS recebeu alíquotas separadas para a identificação viral por RT-PCR e/ou isolamento viral em cultura de células. As amostras depois de recebidas e tratadas foram conservadas no LVRS à 70 °C.

Durante o período estudado, de 2003 a 2012, foram selecionadas 39 casos de sarampo caracterizados como genótipo D4 pela análise molecular do fragmento N, destes apenas 37 casos possuía material suficiente para o sequenciamento completo do gene H. Estes 37 casos possuíam um total de 76 espécimes clínicos para serem analisadas por RT-PCR para amplificação do gene H completo, com a seguinte distribuição: 34 amostras de secreção nasofaríngea (SNF), 30 amostras de urina (URN), 11 amostras de sangue total/linfócitos (LNF) e 1 RNA extraído. Das alíquotas recebidas para o isolamento

viral em cultura de células somente em 23 casos apresentavam volume suficiente para esta metodologia. Na figura 4-1 encontra-se representado de forma resumida a distribuição das amostras selecionadas para o estudo.

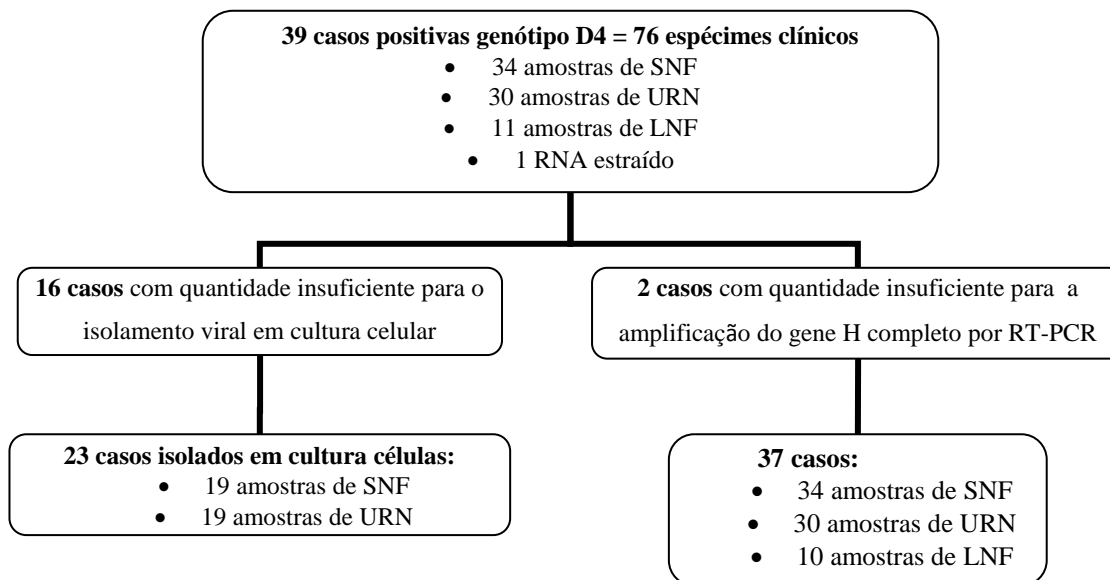


Figura 4-1 Distribuição das amostras selecionadas para a realização do presente estudo

Os casos estudados distribuídos segundo a Unidade da Federação encontram-se descritos na Tabela 4-1.

Tabela 4- 1: Distribuição das 39 amostras positivas para o vírus do sarampo, caracterizadas como genótipo D4 pela análise do gene N incluídas no estudo, segundo o ano e a Unidade Federada.

Ano /UF	SC	BA	PA	SP	RS	MG	DF	MS	PE	RJ	Total/Ano
2003	2										2
2006		7									7
2010			2								2
2011				13	6	1	1	1		5	27
2012									1		1
Total	2	7	2	13	6	1	1	1	1	5	39

Fonte: Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, IOC, FIOCRUZ

4.2. Etapas do estudo

Para a execução deste estudo, diferentes protocolos e técnicas foram utilizados. O fluxograma contendo as etapas envolvidas no desenvolvimento do presente estudo encontra-se ilustrado na Figura 4-2.

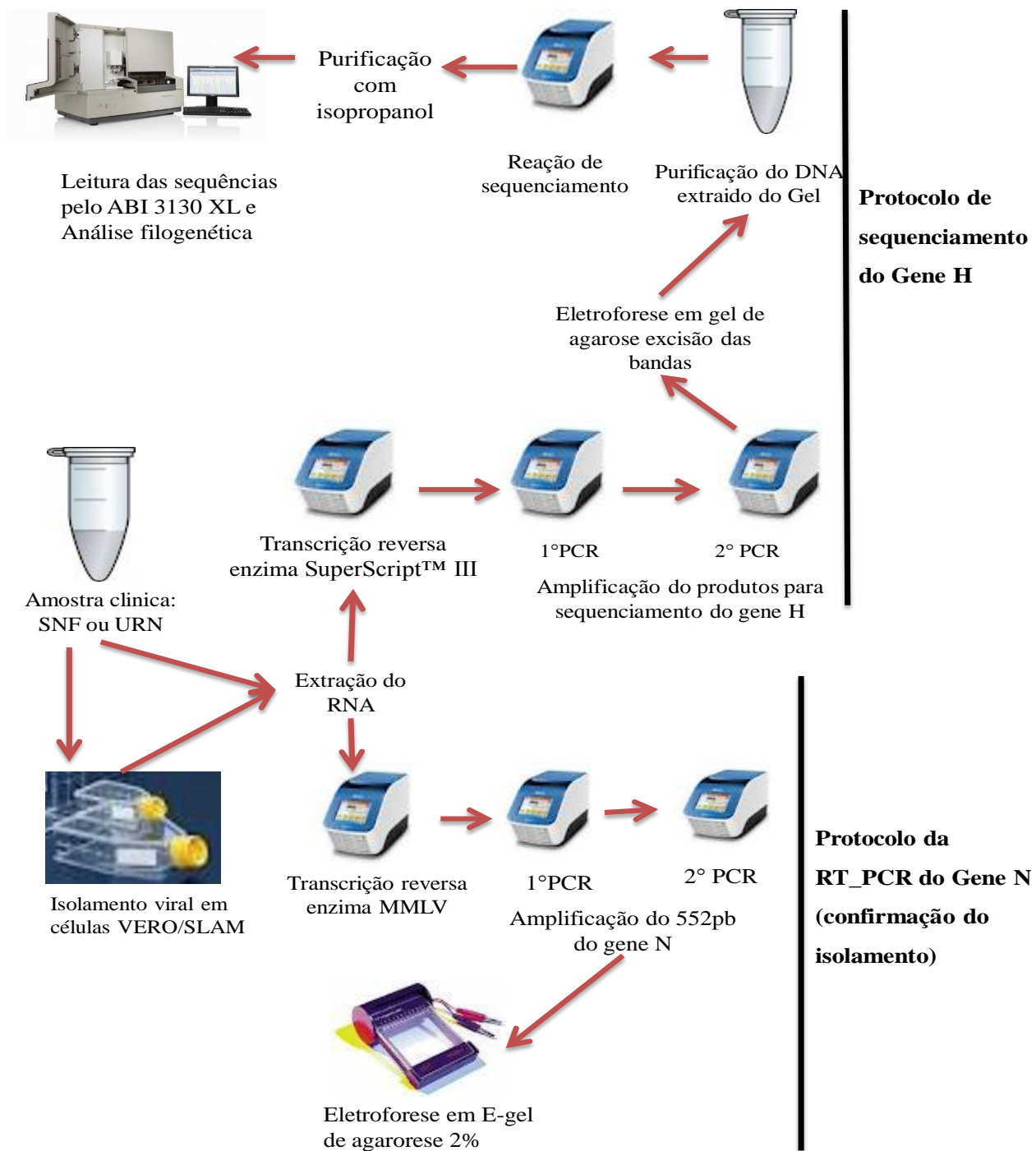


Figura 4-2: Fluxograma das etapas e técnicas utilizadas para a realização do presente estudo

4.3. Isolamento viral em culturas celulares

A inoculação de 19 amostras de secreções nasofaríngeas e 19 amostras de urina dos 23 casos de sarampo em cultura de células da linhagem Vero/SLAM foi feita utilizando o método para o isolamento viral descrito por (WHO, 2007).

4.3.1. Meios utilizados para o isolamento Viral em cultura de células Vero/SLAM

Meio Modificado Eagle (DMEM) (Gibco, Invitroge, USA): com 4,500mg/L D-glucose (high glucose), com L-glutamina, sem piruvato de sódio; a este era adicionado:

- Antibióticos (100X) (Gibco, Invitrogen, USA): 10,000 units/mL penicilina e 10,000 µg/mL sulfato de estreptomicina em uma solução salina a 0,85%
- Geneticina (G418), 50mg/mL, líquida (Invitrogen, USA)
- e Soro Fetal bovino (Gibco, Invitrogen, USA) nas concentrações de 2% e 10%, conforme utilizado para manutenção ou crescimento celular respectivamente.

As células Vero/SLAM (células de rim de macaco verde africano expressando SLAM humano), foram cultivadas em garrafas descartáveis de 75cm² e 25cm² (TPP, Switzerland, Europe) com meio Eagle modificado por Dulbecco high glicose (DMEM) com L-glutamina e sem piruvato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma, USA), na presença dos antibióticos Geneticin (G418) (Invitrogen) na concentração final de 400µg/mL, penicilina e estreptomicina, e incubadas à 37° C. A manutenção das culturas foi feita através de passagens semanais na proporção de 1:5 em relação a cultura da garrafa original. Para efetuar as passagens semanais, as monocamadas celulares confluentes cultivadas em frascos de manutenção eram lavadas uma vez com uma solução de tripsina-EDTA a 0,05% pré-aquecida (Gibco, Invitrogen) e incubadas com 5 mL da mesma solução pré-aquecida a 37°C por cerca de 4-5 minutos. Era descartado o máximo possível da tripsina e as células eram então, resuspensas com 5 a 10 mL de meio DMEM, em seguida era adicionado o meio DMEM com 10% de soro fetal bovino dependendo do volume da garrafa usada (10 mL para garrafa de 25cm² e para garrafa de 75cm² era completado para 30 mL).

As amostras clínicas (secreção de nasofaringe e/ou urina) previamente tratadas com antibióticos e antifúngicos foram inoculados em garrafas de 25cm² contendo monocamada celular com cerca de 75-90% de confluência e com pelo menos um dia após o cultivo. Para cada grupo de amostras inoculadas, foram incluídos controles de vírus (C+) e de células (C-). Para a inoculação era decantado o meio de crescimento e adicionado 5 mL de DMEN com 2% de SFB e de 0,5 a 1 mL da amostra clínica previamente filtrada. Após inoculação os tubos foram incubados à temperatura de 37°C e observados diariamente, por um período de 4-5 dias, em microscópio óptico invertido (Leicca DMIL, Germany). Passados os 4-5 dias as células infectadas eram passadas por tripsinização numa proporção de 1:3 (considerada 2^a passagem). Após 4-5 dias da 2^a passagem mesmo sem a observação do efeito citopático (ECP), as culturas celulares eram testadas por RT-PCR para amplificação da região dos 450pb do gene N. Na presença de efeito citopático, as culturas seriam mantidas e se necessário seriam feita a troca do meio, por um meio DMEN novo com 2% de SFB, até que o efeito citopático fosse visível em pelo menos 50-70% da monocamada celular, condição ótima para a preparação do estoque viral.

Para a preparação do estoque viral, o meio presente na garrafa seria descartado, restando aproximadamente 1 mL do meio, em seguida as células seriam raspadas com ajuda de um raspador de células ou de 1 pipeta de 1 mL, homogeneizadas e feitas alíquotas de 0,5 mL que seriam armazenadas à - 70°C N e uma das alíquotas seria analisada pela técnica molecular RT-PCR para amplificação da região dos 450pb do gene N.

4.4. Extração do RNA

O RNA viral foi extraído diretamente da amostra clínica (Secreção de nasofaríngea e/ou urina) e/ou isolado viral em cultura celular, utilizando o Kit comercial QIAamp viral Mini Kit (Qiagen, Alemanha) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, e devidamente estabelecido pelo POP-LVRS-TC-006 (LVRS, 2010d).

Em um tubo eppendorf de 1,5 mL contendo 140µL da amostra original foi adicionado 560µL de solução desnaturante (tampão AVL+5,6µL de carrier/AVE) capaz de inativar RNases e assegurar a liberação do RNA. A suspensão foi homogeneizada e mantida à temperatura ambiente por 10 minutos. Foram adicionados 560µL de álcool etílico a

100% para permitir a ligação do RNA à membrana de sílica em gel “QIAamp” e a suspensão foi homogeneizada. Em seguida 630 µL da mistura foram transferidos para uma coluna previamente numerada. Após centrifugação por 1 minuto a 8000rpm o eluído do tubo coletor foi desprezado. Novo tubo coletor foi colocado na coluna e os 630µL restantes da suspensão foram transferidos para a coluna e novamente foi centrifugado por 1 minuto a 800 rpm, o eluído foi descartado e a coluna foi transferida para um novo tubo coletor. Os contaminantes foram eliminados em duas etapas de lavagem sucessivas, primeiro foi adicionado 500µL do Tampão de lavagem AW1 e após centrifugação por 1 minuto a 800 rpm o eluído descartado. E na segunda etapa adicionou-se 500 µL do tampão de lavagem AW2, cetrifugado por 3 minutos a 13000 rpm, e o eluído foi descartado. A coluna foi transferida para um eppendorf de 1,5 mL previamente identificado e o RNA foi eluído em 60µL de tampão de eluição (AVE) e após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm o RNA foi estocado a -80°C até ao momento de uso.

4.5. Transcrição Reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) aplicada ao Gene N

A transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela Polimerase (RT-PCR) aplicada ao gene N foi utilizada para a confirmação do resultado do isolamento viral, e realizada baseada na metodologia descrita por Jin L et al, 1996 e ainda o protocolo e os iniciadores recomendados pela WHO, 2004. A reação de transcrição reversa para a síntese de DNA complementar foi feita utilizando a enzima MMLV, estabelecido pelo POP-LVRS-TE-011 (LVRS, 2010f). Em um tubo de 500µL foram adicionados 40µl do RNA extraído do isolados a 60µL da mistura de cDNA, conforme a Tabela 4.2 e homogenizou-se. Posteriormente colocou-se os tubos no termociclador submetidos a 37°C/60 minutos, com um ciclo final de desnaturação de 95°C/5 minutos, para a síntese do DNAC.

Tabela 4- 2: Reagentes da reação de transcrição reversa

Reagentes	Volume
Tampão para PCR 10X	10 µL
MgCl₂ 50mM	3 µL
Desoxiribonucleotídeos (dNTP) 10mM	2 µL
Enzima <i>Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase</i> (M-MLV) 200U/µL (Invitrogen, USA)	2 µL
RNAsin 40U/µL	1 µL
Iniciadores randômicos 3µg/µL (<i>Random hexamer primer</i>, Invitrogen, USA)	1 µL
Água livre de DNAses e RNAses	41 µL

Fonte: POP-LVRS-TE-011 (LVRS, 2010f)

A partir do cDNA, realizou-se duas etapas consecutivas de PCR para a amplificação de um fragmento de 450pb do gene N, nas quais foram utilizados os iniciadores descritos na Tabela 4.3.E a metodologia encontra-se padronizada e estabelecida no LVRS pelo POP-LVRS-TE-018 (LVRS, 2010g).

Tabela 4- 3: Sequências dos Iniciadores utilizados na amplificação do gene N

	Iniciadores	Sequencia 5' -3'	Posição dos nucleotídeos	Tamanho do fragmento (em pares de bases [pb])
1ª	n1	GCT ATG CCA TGG GAG TAG GA		
PCR	n2R	GGC CTC TCG CAC CTA GTC TA		
2ª	n3	CCA TGG GAG TAG GAG TGG		
PCR	n4R	CTC TCG CAC CTA GTC TAG 3		

Fonte: POP-LVRS-TE-018 (LVRS, 2010g)

Na primeira PCR, 20µL do produto da transcrição reversa (cDNA) era acrescentado a um volume de 30µL da mistura do 1º PCR (Tabela 4-2) em tubos de 0,2mL previamente identificados. As condições de termociclagem consistiram de 95°C/3minutos para desnaturação inicial, seguidos de 10 ciclos de 95°C/30segundos, 57°C/30segundos, 72°C/60segundos, seguidos por 20 ciclos de 95°C/30 segundos, 57°C/ 30 segundos, 72°C/1minuto e 5segundos, e a extensão final a 72°C/7minutos.

Na segunda etapa da amplificação (Nested PCR), utilizamos 10µL do produto do 1º PCR que eram acrescentados a 40µL da mistura do segundo PCR (tabela 4-4). As

condições de amplificação destes produtos foram idênticas às descritas para a primeira PCR.

Tabela 4- 4: Reagentes utilizados para PCR aplicada ao gene N

Reagentes	Volume	
	1º PCR	2º PCR (Nested)
Tampão para PCR	5 µL	5 µL
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µL	1,5 µL
Desoxirribonucleotídeos (dNTP) 10mM	1 µL	1 µL
Iniciador n1 (10pmol)	1 µL	-
Iniciador n2R (10pmol)	1 µL	-
Iniciador n3 (25pmol)	-	1 µL
Iniciador n4R (25pmol)	-	1 µL
Enzima Taq Platinum polimerase a 5U/µL (Invitrogen, USA)	1 µL	1 µL
Água livre de DNAses e RNAses	20,5 µL	30,5 µL
Volume final	30 µL	40 µL

Fonte: POP-LVRS-TE-018 (LVRS, 2010g)

Para a análise dos produtos amplificados, 5µL do produto do segundo PCR + 15µL de água foram submetidos à eletroforese em E-gel de agarose a 2% (Invitrogen, USA), visualizados em um traniluminador com luz ultravioleta (UV), conforme descrito no POP-LVRS-TC-001 (LVRS, 2010a)

4.6. Amplificação do fragmento gênico H para sequenciamento

A reação de RT-PCR do fragmento gênico H completo foi realizada conforme a metodologia descrita por Kessler e colaboradores em 2011 (Kessler *et al.*, 2011).

4.6.1. Síntese de cDNA

A mistura 1 contendo: 1µL de água livre de nucleases, 1µL dos desoxirribonucleotídeos dNTP (dATP, dGTP, dCTP and dTTP) a 10mM, 5µL de iniciadores randômicos a 0.03µg/µL (*Random hexamer primer* – Invitrogen, USA), foi adicionado a 5µL do RNA extraído diretamente da amostra clínica (descrito no ponto 4-4.), perfazendo um volume

total de 12µL que foi aquecida a 65°C por 5 minutos e posteriormente foi mantido em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 8µL da mistura 2 contendo: 0,5µL RNAsin 40U/µL (Invitrogen, USA), 0,5µL de água livre de DNAses e RNAses, 4µL de 5X First-Strand Buffer 5x, 2µL de Dithiothreitol (DTT) e 1µL da enzima *SuperScript™ III reverse transcriptase* a 200 U/µL (Invitrogen, USA). A mistura final (mistura 1+RNA+mistura 2) foi submetida à 25°C/5 minutos; 50°C/80 minutos e por fim à 72°C/15 minutos para extensão. O cDNA sintetizado foi estocado a -20°C, ou imediatamente usado para a reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.6.2. Padronização da reação de síntese de cDNA

Para as amostras mais antigas, do ano de 2003 e 2006, foi feita uma padronização da reação de síntese do cDNA, onde primeiramente testamos a concentração dos iniciadores randômicos (*Random hexamer primer* – Invitrogen, USA), a 0.03µg/µL e à 3µg/µL. E na segunda fase testamos os iniciadores reversos específicos (H6 e H2) à 25pmol/µL, descritos por Kessler *et al.*, 2011 (Figura 4-2).

Padronizamos o ensaio com os iniciadores reversos específicos (H6 e H2) à 25pmol/µL, com os seguintes componentes da mistura 1: 1µL de água livre de nucleases, 1µL dos desoxirribonucleotídeos dNTP (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) a 10mM, 1µL iniciadores reversos específicos (H6 e H2) à 25pmol/µL, foi adicionado a 5µL do RNA extraído diretamente da amostra clínica (descrito no ponto 4.4), perfazendo um volume total de 12µL que foi aquecida a 65°C por 5 minutos e posteriormente foi mantido em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 8µL da mistura 2 contendo: 0,5µL RNAsin 40U/µL (Invitrogen, USA), 0,5µL de água livre de DNAses e RNAses, 4µL de 5X First-Strand Buffer 5x, 2µL de Dithiothreitol (DTT) e 1µL da enzima *SuperScript™ III reverse transcriptase* a 200 U/µL (Invitrogen, USA). A mistura final (mistura 1+RNA+mistura 2) foi submetida à 25°C/5 minutos; 50°C/80 minutos e uma extensão final à 72°C/15 minutos. O cDNA sintetizado foi estocado a -20°C, ou imediatamente usado para a reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.6.3. Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)

A partir do cDNA, realizamos duas etapas consecutivas de PCR, em um procedimento “*semi-nested*” nas quais utilizamos as estratégias ilustradas na Figura 4-2.

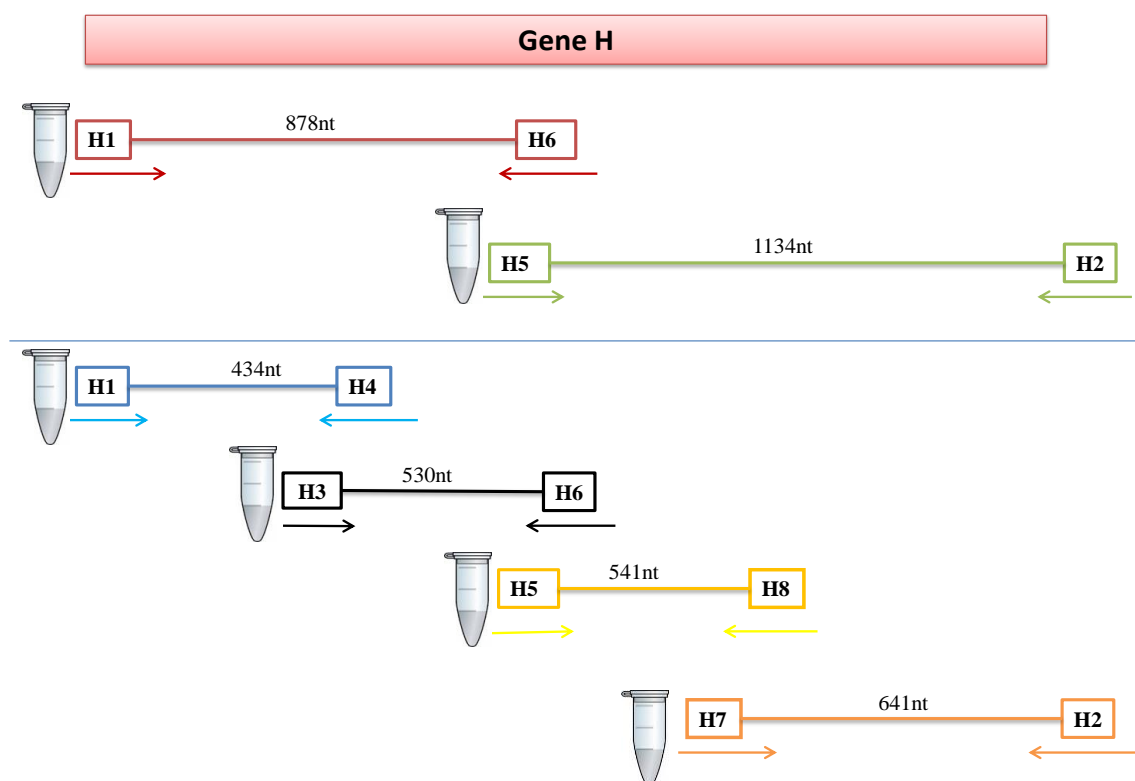


Figura 4- 1: Ilustração da estratégia utilizada para a amplificação e sequenciamento da gene H completo.

Na primeira PCR, foram amplificados dois fragmentos, um de aproximadamente 878 e 1134 pares de base (pb) utilizando os iniciadores H1-H6 e H5-H2 respectivamente. Na segunda PCR procurou-se gerar produtos menores para o sequenciamento: em 4 reações combinamos os iniciadores diferentes, uma com o iniciador H1 D (direto) com o iniciador H4 R (reverso) (que gera um produto de cerca de 434 pb), em outra reação, o iniciador H3 D com o H6 R (530 pb), outra reação com o iniciador H5 D com o H8 R (541 pb) e outra reação com o iniciador H7 D e o H2 R (641 pb). As sequências características de cada iniciador utilizado encontram-se descritas na Tabela 4-5. Os

iniciadores reversos H4 e H8 foram cedidos por Kessler J (as sequências dos iniciadores foram enviadas por e-mail).

Tabela 4- 5: Informações gerais dos iniciadores para o Gene H

Iniciadores	Sequência (5'-3')	Posição do nucleotídeos	Tamanho do fragmento (em pares de bases[pb])
H1	TTAAAACCTTAGGGTGCAAGATCATCCACA	7242–7270	H1-H6, 878
H6	GACCATTACTGACTGGTTGCTCAA	8097–8120	
H5	GTACCGAGTGTTTGAAGTAGGTGTTA	8023–8048	H5-H2, 1134
H2	GGGTGACATCATGTGATTGGTTCA	9134–9157	
H4	TATCCCTCATGCTGAAGTCTCTAG	7653–7676	H1-H4, 434
H3	CACCTCAGAGATTCAGTACCTAGT	7590–7614	H3-H6, 530
H8	TAACTAGTGTGTGCCGAGTCC	8569–8589	H5-H8, 541
H7	GATCTGAGTCTGACAGTTGAGCTTA	8516–8540	H7-H2, 641

Fonte: Kessler *et al.*, 2011(Kessler *et al.*, 2011); Kessler, por e-mail.

4.6.3.1. Primeira reação de PCR:

Para a realização da primeira PCR, utilizamos os seguintes componentes: 1µL dos iniciadores a 25pmol/µL; 1µL de MgCl₂ (50mM); 18,9µL de água livre de DNAses e RNAses; 0,5µL de desoxinucleotídeos (dNTPs) a 10mM; e 0,1µL de enzima Taq Platinum polimerase a 5U/µL (Invitrogen, USA). A esta mistura foram adicionados 1µL de DNAc, gerados na reação de RT, perfazendo um volume final de 25µL. Após a mistura os componentes foram submetidos á amplificação com o auxílio de um termociclador Mastercycler gradiente (Eppendorf), equipamento que permite variar automaticamente as condições de temperatura e tempo. Para a desnaturação inicial das moléculas, utilizamos a temperatura de 94°C/1,5min. A seguir, programamos 35 ciclos para amplificação de 94°C/30seg para desnaturação, 53°C/1min anelamento, 72°C/1min para extensão e 1 ciclo final de 72°C/5min.

4.6.3.2. Segunda reação de PCR:

Na segunda reação (semi-nested PCR), adicionou-se em microtubos de 200µL, 5 µL do produto amplificado na primeira PCR diluído (1:50) a mistura contendo: 13,9µL água livre de DNAses e RNAses; 1µL de MgCl₂ a 50 mM; 0,5 de dNTP a 10mM; 1µL de iniciadores, direto e reverso; e 1µL da Taq Platinum Polimerase 5U/µL (Invitrogen,

USA), perfazendo um volume total de 25µL. Colocou-se os microtubos no termociclador previamente programado para 94°C/90seg para a desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos para a amplificação de 94°C/30seg para desnaturação, 58°C/1min para hibridização, 72°C/1min para extensão e 1 ciclo final de 72°C/5min.

Para a análise dos amplicons, foi realizada eletroforese em E-Gel agarose 2% (Invitrogen, USA), visualizados em um transiluminador com luz, conforme descrito no POP-LVRS-TC-001 (LVRS, 2010a).

4.7. Purificação dos produtos da reação de RT-PCR

Todo o volume dos amplicons gerados após a segundo PCR, foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% para a verificação e excisão dos produtos amplificados. Aplicou-se todo o produto resultante da segunda PCR, mais 2µL de azul de bromofenol e procedeu-se a eletroforese a 60V-50mA/ 2horas. Os produtos de interesse foram cortados do gel com uma lâmina de bisturi e armazenados em tubos de 1,5mL (Eppendorf). Após a excisão, os produtos foram purificados a fim de remover dNTPs e iniciadores residuais da reação de RT-PCR, utilizando o kit comercial QIAquick Gel Extraction (GIAGEN, Alemanha) conforme o POP-LVRS-TC-004 (LVRS, 2010b). Adicionou-se 500µL de tampão QG as bandas cortadas no gel de agarose. Os tubos foram homogeneizados e incubados por 10 minutos com agitação em vortex a cada 2-3minutos. Após a completa dissolução do gel, a coloração da mistura foi observada, tendo que estar com uma coloração amarela. Caso a mistura estivesse laranja ou violeta, 10µL de 3M acetato de sódio era adicionado. As misturas foram transferidas para as colunas e centrifugada por 1 minuto a 13000 rpm em microcentrifuga. O eluído do tubo coletor foi descartado e 500µL de tampão QG foram acrescentados na coluna. Após centrifugação por 1 minuto a 13000 rpm, foi realizada a lavagem com 750 µL do tampão PE. Após incubação de 2 a 5 minutos, foi efetuada uma nova centrifugação por 1 minuto a 13000 rpm e o eluído foi descartado. A coluna foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5mL previamente identificado, e o DNA purificado foi eluído pela adição de 30µL de eluente EB, incubado por 1 minuto a temperatura ambiente e a seguir centrifugado por 1 minuto a 13000 rpm. O DNA já purificado foi estocado a -20°C ate ao momento da utilização.

4.8. Quantificação do DNA

A quantificação de DNA, foi realizada conforme estabelecido no POP-LVRS-TC-003 (LVRS, 2010c) e, baseou-se na comparação da intensidade de brilho do marcador *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen, USA) com a intensidade de brilho das bandas dos produtos purificados, após a eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Na eletroforese em gel de agarose a 2% ou em E-Gel agarose 2% (Invitrogen, USA) foi aplicado 4µL do DNA purificado e do marcador molecular *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen, USA) e 2µL do tampão de solubilização de amostra (azul de bromofenol a 0,05% e xileno cianol a 0,05%). Após a coloração do gel em solução de Brometo de Etídeo (10mg/mL) a visualização das bandas foi realizada em transiluminador com luz Ultravioleta (UV). Dessa forma foi possível comparar a intensidade de brilho dos produtos e quantificar as amostras que apresentarem 40 a 80ng de DNA, quantidade ideal para a realização do sequenciamento.

4.9. Reação de sequenciamento para o Gene H completo

Após quantificação dos fragmentos de DNA amplificados foram sequenciados em ambos os sentidos utilizando o Kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing 5.0v (Applied Biosystems, EUA), seguindo a metodologia descrita no POP-LVRS-TC-007 (LVRS, 2010e). A reação de sequenciamento foi composta por 2µL de BigDye, 3µL de tampão de diluição 5X, 1µL do iniciador com 1-2µL do produto do RT-PCR purificado (dependente da concentração), completando com água para um volume final de 20µL. Cada um dos iniciadores estava na concentração de 3,2pmol. As condições de termociclagem consistiram de 30 ciclos de 96 °C/10seg, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

4.10. Purificação do DNA

Após a reação de sequenciamento o DNA foi precipitado e purificado utilizando isopropanol com o objetivo de remover o excesso de “dideoxynucleotídeos” terminadores da reação de sequenciamento não incorporados e precipitar o DNA, esta técnica encontra-se estabelecida no LVRS pelo POP-LVRS-TC-018 (LVRS, 2012). Foi adicionado 80µl de isopropanol a 75% em cada reação de sequenciamento de 20µl, em

seguida agitado no vortex e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após ter sido centrifugado durante 45 minutos a 4000 rpm, a temperatura ambiente, o isopropanol foi cuidadosamente removido invertendo a placa em papel absorvente. A placa foi seca no termobloco a 75°C por 5 minutos. No final o DNA já purificado foi ressuspensão em 20µl de formamida HiDi (Applied Biosystems, EUA) para posterior sequenciamento.

4.11. Sequenciamento dos nucleotídeos e alinhamento das sequências

O sequenciamento foi realizado em plataforma capilar, automatizada ABI 3130XL (Applied Biosystem EUA), de 16 capilares, através de injeção eletrocínica. O polímero utilizado foi o POP-7 (Applied Biosystem, EUA) nas condições padrões do equipamento. Os electroferogramas gerados pelo sequenciador foram analisados utilizando-se o programa Sequencher 5.0.

4.12. Análise filogenética

As sequências foram alinhadas no programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011), onde também foram realizadas as análises filogenéticas. As árvores filogenéticas foram construídas com o uso do método de Máxima verossimilhança (Strimmer & Moulton 2000) com re-amostragem – “bootstap”, 1000 repetições (Felsenstein, 1985). De formar a determinar o melhor modelo a ser usado para calcular as distâncias evolucionárias foi usada a ferramenta “Modeltest” do programa MEGA 5.0, que determinou que o modelo *kimura-2-parâmetros* (Kimura, 1980) seria o melhor a ser utilizado neste estudo. A taxa de variação entre as posições foi modelada com a *distribuição gamma* e todas as posições que continham lacunas de alinhamento e dados perdidos foram eliminados apenas coma utilização da opção *Pairwise deletion*.

Para confirmar o genótipo das amostras, foram utilizadas as sequencias referência do gene N parcial e do gene H completo para os diferentes genótipos do vírus do sarampo publicadas no GenBank e previamente estabelecidos pela OMS e CDC. As sequências para o gene N dos 39 casos de sarampo genótipo D4 analisadas neste trabalho, foram obtidas no momento da coleta. As mesmas foram obtidas no banco de dados do LVRs e a maior parte delas já encontram disponíveis no GenBank, descritas na tabela com o

respectivo número de acesso. E para as sequências geradas neste trabalho correspondentes ao gene H completo, estas foram depositadas no GenBank e os números de acesso encontram-se descritos na Tabela 4-6 .

Tabela 4- 6: Número de acesso das seqüências dos genes N parcial e H completo* do vírus do sarampo depositadas no GenBank

Identificação	Acesso no GenBank	
	Gene N	Gene H
MVs/SantaCatarina.BRA/48.03	KC291531	-
MVs/SantaCatarina.BRA/50.03	GU269275	KC291539
MVs/Bahia.BRA/43.06	KC291534	-
MVs/Bahia.BRA/45.06	GU269278	-
MVs/Bahia.BRA/45.06/2	KC291535	-
MVs/Bahia.BRA/46.06	KC291536	-
MVs/Bahia.BRA/46.06/2	KC291532	Aguarda liberação**
MVs/Bahia.BRA/46.06/3	KC291533	-
MVs/Bahia.BRA/51.06	GU269279	-
MVs/Para.BRA/30.10	HQ234915	-
MVs/Para.BRA/30.10/2	HG891120	Aguarda liberação**
MVs/SaoPaulo.BRA/5.11	JN248793	-
MVs/MataGrossdoSul.BRA/10.11	JN248789	KC291549
MVs/RioGrandedoSul.BRA/13.11	JN248794	KC291543
MVs/RioGrandedoSul.BRA/14.11	JN248795	KC291542
MVs/RioGrandedoSul.BRA/16.11	JN248796	KC291541
MVs/RiodeJaneiro.BRA/17.11	JN248790	KC291546
MVs/RioGrandedoSul.BRA/17.11	JQ2464504	-
MVs/DistritoFederal.BRA/18.11	JQ246499	-
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11	JQ2464500	KC291544
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11/1	JN248791	KC291545
MVs/RioGrandedoSul.BRA/19.11	JQ2464503	-
MVs/RioGrandedoSul.BRA/20.11	JN248797	-
MVs/SaoPaulo.BRA/21.11	JQ246490	-
MVs/SaoPaulo.BRA/21.11/1	JQ246489	-
MVs/RiodeJaneiro.BRA/22.11	JQ2464501	-
MVs/RioGrandedoSul/23.11	JQ2464505	KC291540
MVs/SaoPaulo.BRA/32.11	JQ246491	-
MVs/SaoPaulo.BRA/34.11	JQ246492	-
MVs/SaoPaulo.BRA/37.11	JQ246493	-
MVs/SaoPaulo.BRA/37.11/1	JQ246494	-
MVs/SaoPaulo.BRA/37.11/2	KC291537	-
MVs/SaoPaulo.BRA/39.11	JQ246298	-
MVs/SaoPaulo.BRA/40.11	JQ246495	-
MVs/SaoPaulo.BRA/41.11	JQ246497	-
MVs/MinasGerais.BRA/41.11	JQ2464502	KC291548
MVs/SaoPaulo.BRA/42.11	JQ246496	KC291538
MVs/SaoPaulo.BRA/51.11	JQ699289	-
MVs/Pernambuco.BRA/2.12	JQ699290	KC291547

*As seqüências do gene H completo foram obtidas neste trabalho.

** já foram enviadas para publicação no GenBank, aguardando liberação e envio dos respectivos números de acesso.

- não foram obtidas as respectivas seqüências neste trabalho

A variabilidade das sequências obtidas neste trabalho foram analisadas utilizando o fragmento do gene N parcial e do gene H completo em relação à referência para o genótipo D4, Mvi/Montreal.CAN/89 (AF079554 e U01976) e as sequências disponíveis no GenBank para esse gene. E para a análise das substituições no gene H completo foi utilizada a amostra da sequência vacinal - Schwarz (U03667 e AF266291).

4.13. Considerações Éticas

As amostras de secreção de nasofaringe e urina que foram utilizadas neste estudo provêm da demanda espontânea do Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, IOC, FIOCRUZ. Essas amostras foram coletadas no âmbito do Programa de Vigilância Epidemiológica do Sarampo do Ministério da Saúde do Brasil para investigação de surto, identificação do vírus e/ou caracterização do vírus do sarampo no Brasil. Portanto, sem necessidade de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Neste trabalho, a identidade de todos os pacientes foi preservada, uma vez que as amostras foram identificadas apenas pelo número de registro de entrada no banco de dados do LVRS.

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento do vírus do sarampo em culturas celulares Vero/SLAM

Do banco de dados do LVRS, foi possível selecionar 39 casos positivos para o vírus do sarampo, genótipo D4, previamente identificados pela amplificação parcial do gene N através do ensaio de RT-PCR, quando da análise inicial a partir da chegada das amostras biológicas ao LVRS. Destes 39 casos de sarampo genótipo D4, 16 não apresentaram material biológico suficiente para os ensaios de isolamento em cultura de células. As 38 amostras pertencentes aos 23 casos com volume suficiente para o isolamento viral, foram então inoculadas em cultura de células Vero/SLAM (Figura 5-1). Esse ensaio deveria ter resultado em um efeito citopático (formação de pequenos sincícios) característico para o vírus do sarampo, como ilustrado na Figura 5-2.

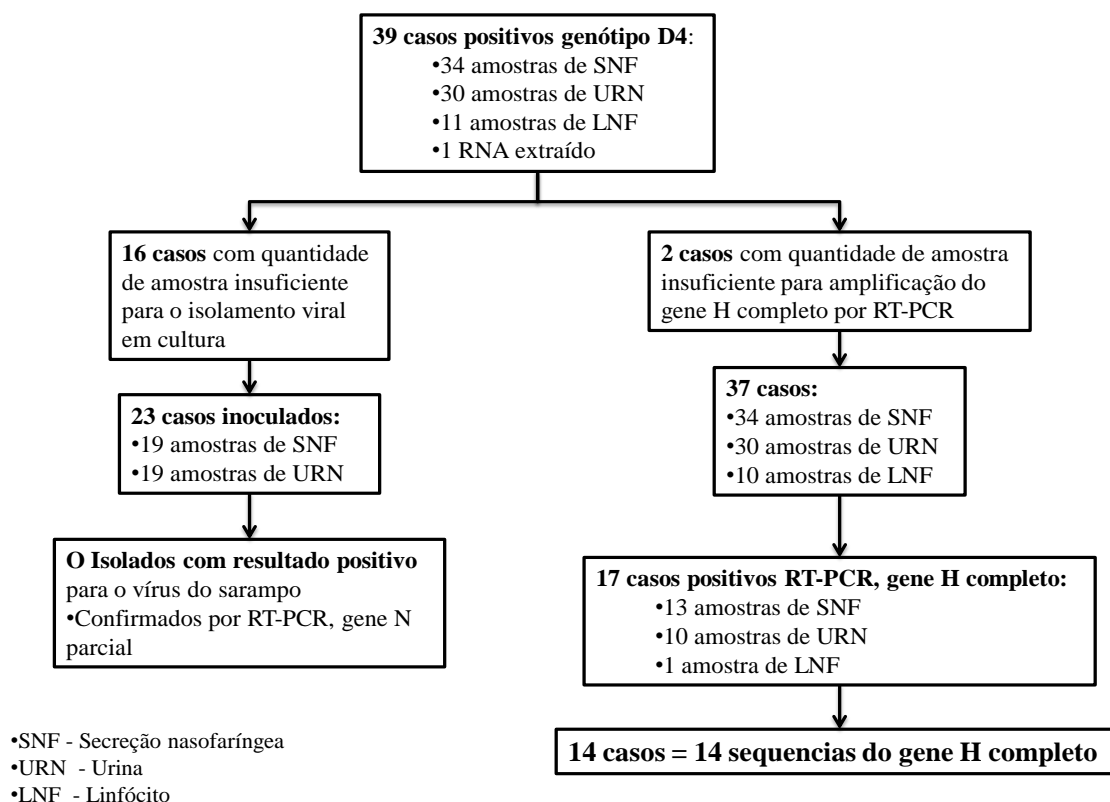


Figura 5-1: Fluxograma de seleção das amostras para o ensaio realizado.

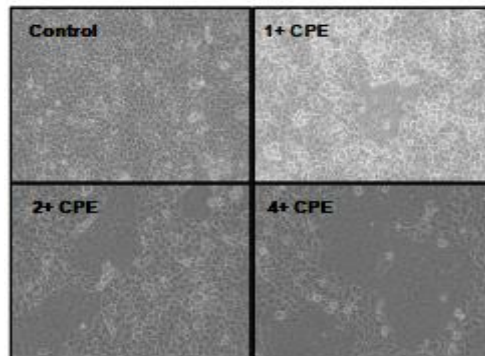


Figura 5-2: Ilustra o efeito citopático (CPE) em células Vero/hSLAM causado pelo vírus do sarampo.

Fonte: (WHO 2007)

Entretanto, em nenhuma das 38 amostras (19 amostras de SNF e 19 amostras URN) inoculadas em cultura, observou-se efeito citopático, mesmo após repetição do ensaio. Este resultado negativo foi confirmado pela realização do ensaio de RT-PCR do sobrenadante das culturas para amplificação do fragmento gênico N de 552pb mostrado na Figura 5-3.

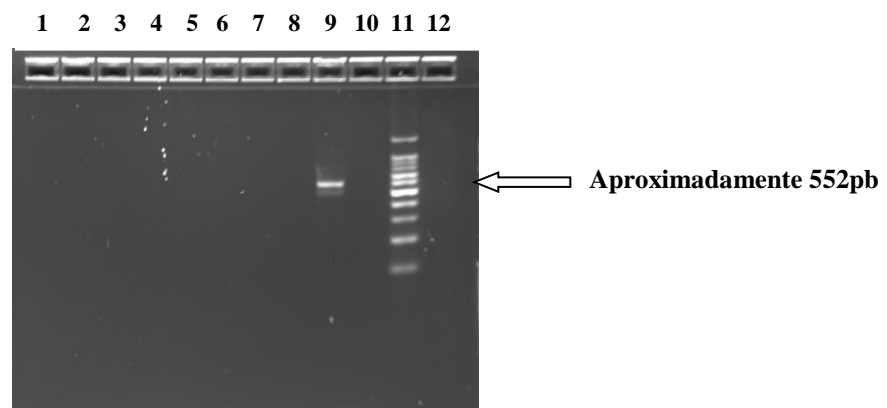


Figura 5-3: Gel de agarose a 2% após eletroforese apresentando os produtos da amplificação do gene da proteína n, obtidos na reação de RT-PCR.

Poço 1: controle negativo da reação de RT-PCR. Nos poços 2-8 amostras isoladas obtidas após inoculação em células Vero/SLAM foram negativas após a reação de RT-PCR para amplificação do fragmento gênico N. Poço 9: controle positivo da reação de RT-PCR. Poço 10: água. Poço 11: marcador molecular de 100pb. Poço 12: água

5.2. Análise filogenética do gene N parcial (450 nucleotídeos)

A OMS recomenda o sequenciamento dos 450 nucleotídeos que codificam os 150 aminoácidos da parte COOH terminal da proteína N, como sendo o fragmento mínimo para a genotipagem do vírus do sarampo a partir de isolados ou diretamente de amostras

clínicas (WHO, 2012). Realizamos o alinhamento das sequências parciais do gene N previamente obtidas durante a rotina do laboratório- LVRS e disponíveis no GenBank, referentes aos 39 casos de sarampo, genótipo D4.

As relações filogenéticas entre as sequências brasileiras de vírus do sarampo e as diferentes cepas referência para os genótipos definidos e reconhecidos pela OMS podem ser visualizadas na árvore filogenética ilustrada na Figura 5-4. Demonstra-se que as amostras brasileiras pertencem ao genótipo D4.

As sequências do ano de 2003, coletadas no estado de Santa Catarina, quando comparadas com a sequência referência (gene N parcial) para o genótipo D4, MVi/Montreal.CAN/89, apresentaram um percentual de divergência de nucleotídeos de 2,0%, e para as sequências de 2006 coletadas no estado da Bahia os percentuais de divergência variaram de 2,5% à 2,9%.

As sequências parciais do gene N dos anos de 2010 e 2011 quando comparadas entre si, mostraram-se idênticas, à exceção das sequências MVs/SaoPaulo.BRA/51.11, MVs/SaoPaulo.BRA/37.11/2 e MVs/MinasGerais.BRA/41.11 que ao serem comparadas com as demais sequências brasileiras dos mesmos anos apresentaram um percentual de divergência de 0,2%. Por outro lado, as amostras dos anos de 2010 e 2011, quando comparadas com a sequência referência MVi/Montreal.CAN/89, apresentaram uma divergência de 2,5 % a 2,8%.

Para a sequência MVs/Pernambuco.BRA/2.12, o percentual de divergência de nucleotídeos foi de 3,0% quando comparada com a sequência referência para o genótipo D4 (MVi/Montreal.CAN/89).

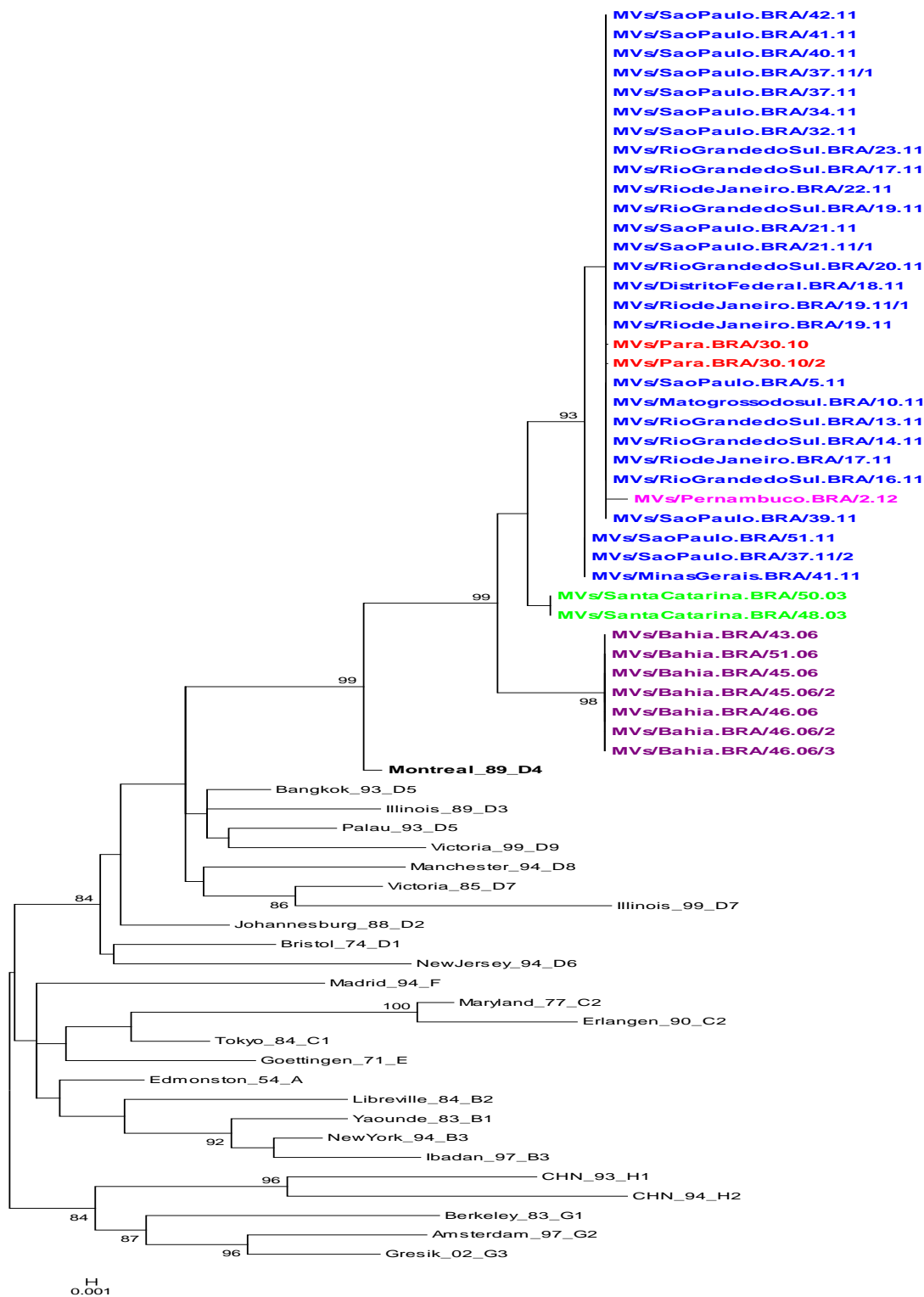


Figura 5-1: Relação filogenética das amostras do vírus do sarampo (região C-terminal da proteína N) do genótipo D4 circulantes no Brasil em 2003, 2006, 2010, 2011 e 2012 e as cepas referências dos principais genótipos.

Árvore filogenética inferida pelo método de Máxima verossimilhança. Os valores de *bootstrap*, acima de 80% encontram-se indicados próximos aos ramos. As distâncias evolucionárias foram calculadas com base no modelo *kimura-2-parâmetros*. A taxa de variação entre as posições foi modelada com a *distribuição gamma*. Os anos das coletas das amostras deste estudo estão evidenciados em cores diferentes, 2003 cor verde, 2006 cor púrpura, 2010 cor vermelha e 2012 cor lilás. Sequências das cepas referências dos principais genótipos já descritos para o vírus do sarampo e reconhecidos pela OMS.

5.3. Análise da variabilidade da sequência do gene N parcial

Para a melhor caracterização das nossas amostras, construímos uma árvore filogenética com as sequências brasileiras do genótipo D4 analisadas neste estudo e as sequências do mesmo genótipo circulantes no mundo. A árvore filogenética se encontra na Figura 5-5.

Em 2003, as amostras MVs/SantaCatarina.BRA/48.03 e MVs/SantaCatarina.BRA/50.03 coletadas no estado de Santa Catarina se agruparam no mesmo ramo com a sequência MVs/Zagreb.HRV.48.03.

As amostras de 2006 que foram coletadas no estado da Bahia se agruparam no mesmo ramo com as amostras do Canadá (Mvi/Quebec/38.7), da Índia (MVs/VALSAD.IND/17.10/7) e da Polônia (Mvi/warsaw.POL/28.06).

Em 2010, as amostras MVs/Para.BRA/30.10 e MVs/Para.BRA/30.10/2, coletadas no Pará, se agruparam com as amostras de 2011 coletadas nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Distrito Federal, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Rio de Janeiro, que por sua vez se agruparam no mesmo ramo com as amostras de vários países da Europa do anos 2009, 2010 e 2011 e dos Estados Unidos coletadas em 2009.

Em 2011, as sequências MVs/SãoPaulo.BRA/37.11/2, MVs/MinasGerais.BRA/41.11 e MVs/SãoPaulo.BRA/51.11 agruparam-se entre si no mesmo ramo, nestas identificamos a alteração V475I, o que provavelmente as distanciou das demais amostras do mesmo ano. A sequência MVs/Pernambuco.BRA/2.12 e as demais sequências da Europa e EUA que se agruparam entre si no mesmo ramo apresentaram a alteração P472L, o que as distanciou das demais amostras na árvore. Esta alteração somente foi identificada nessas sequências em relação às demais sequências analisadas e descritas na árvore.

A análise das sequências brasileiras da região C-terminal do gene do N pertencentes ao genótipo D4 mostrou a circulação de diferentes linhagens, indicando que estes casos de sarampo resultam de importações e/ou de casos relacionados à importação de países da Europa. Neste continente o genótipo D4 tem sido relacionado a vários surtos e casos esporádicos.

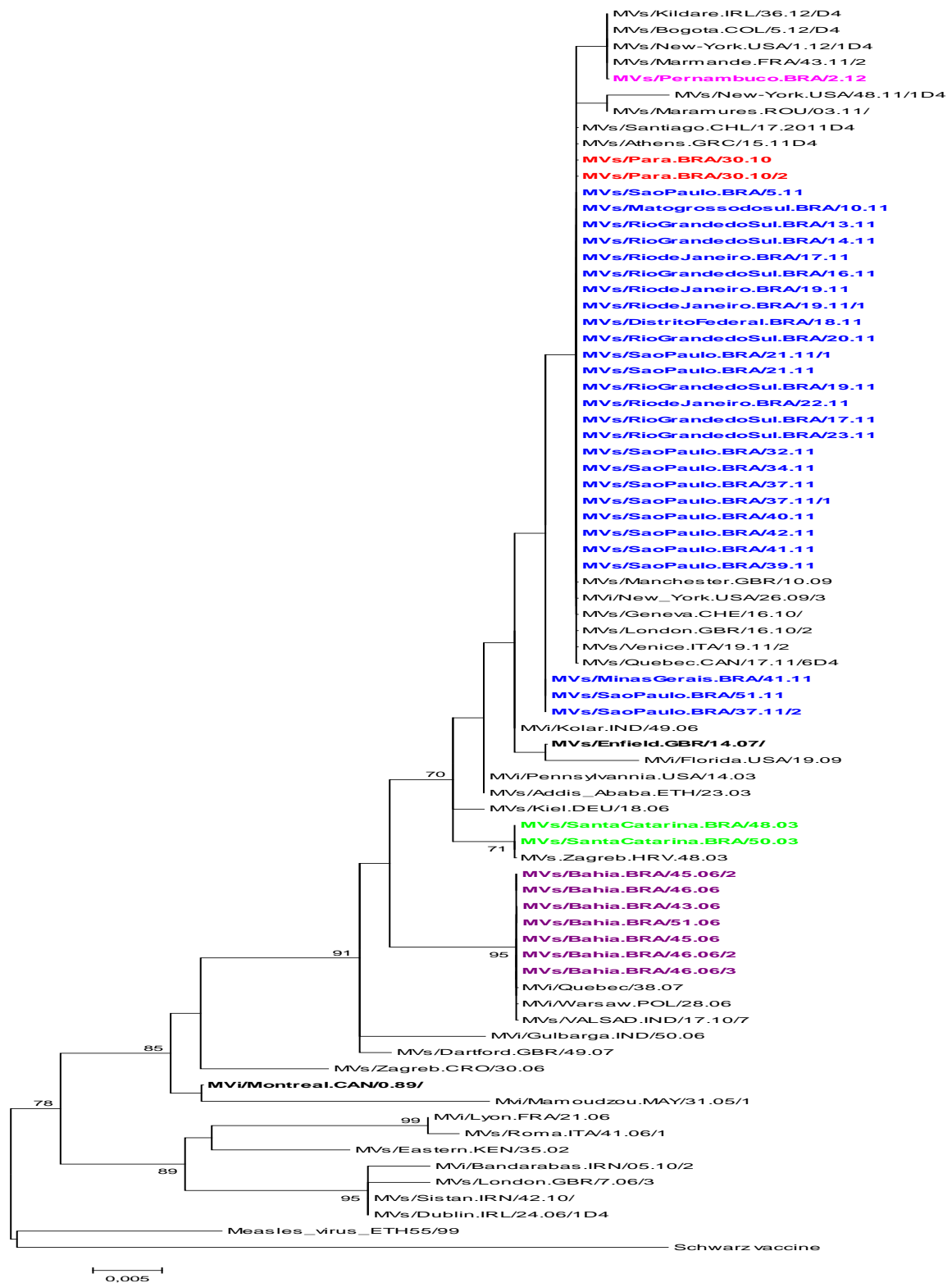


Figura 5-2: Relação filogenética das amostras do vírus do sarampo (região terminal dos 450 nucleotídeos variáveis do gene N) do genótipo D4 circulantes no Brasil em 2003, 2006, 2010, 2011 e 2012 e as cepas circulantes no mundo.

Árvore filogenética inferida pelo método de Máxima verossimilhança. Os valores de *bootstrap*, acima de 65% encontram-se indicados próximos aos ramos. As distâncias evolucionárias foram calculadas com base no modelo *kimura-2-parâmetros*. A taxa de variação entre as posições foi modelada com a *distribuição gamma*. Os anos das coletas das amostras deste estudo estão evidenciados em cores diferentes, 2003 cor verde, 2006 cor púrpura, 2010 cor vermelha e 2012 cor lilás.

Todas as amostras brasileiras dos anos de 2012, 2011 e 2012 dos vírus do sarampo genótipo D4 analisadas neste estudo agrupam-se em um ramo muito próximo da amostra MVs/Enfield.GBR714.07, que apresentou muitas variantes em circulação na Europa em 2011 (WHO 2011). Ao fazermos uma comparação entre elas, foi obtido um percentual de divergência de nucleotídeos de 0,2 e 0,4%, como podemos observar na árvore filogenética apresentada na Figura 5-5. Estes resultados ilustram claramente a diferentes introduções do genótipo D4 no Brasil.

O alinhamento das sequências de aminoácidos das amostras brasileiras dos anos de 2003, 2006, 2010, 2011 e 2012 dos vírus do sarampo genótipo D4 analisadas neste trabalho com a amostra padrão Schwarz encontram-se na Tabela 5-1.

Tabela 5- 1: Alinhamento de aminoácidos das 39 sequências do gene N (região C-terminal da proteína N) do vírus do sarampo, com a cepa vacinal Schwarz e a cepa Montreal referência para o genótipo D4.

	375	385	395	405	415	425	435	445
Schwarz_vaccine	KVSSTLASEL	GITAEDARLV	SEIAMHTTED	KISRAVGPQ	AQVSFLHGDQ	SENELPRLGG	KEDRRVKQSR	GEARESRET
MVi/Montreal.CAN/0.89/	R.....I.....G.....
MVs/SantaCatarina.BRA/50.03	R.....I.....G.S.....G.....
MVs/SantaCatarina.BRA/48.03	R.....I.....G.S.....G.....
MVs/Bahia.BRA/43.06	R.....I.....G.....G.....H.....
MVs/Bahia.BRA/45.06	R.....I.....G.....G.....H.....
MVs/Bahia.BRA/45.06/2	R.....I.....G.....G.....H.....
MVs/Bahia.BRA/46.06	R.....I.....G.....G.....H.....
MVs/Bahia.BRA/46.06/2	R.....I.....G.....G.....H.....
MVs/Bahia.BRA/46.06/3	R.....I.....G.....G.....H.....
MVs/Bahia.BRA/51.06	R.....I.....G.....G.....H.....
MVs/Para.BRA/30.10	R.....I.....G.....G.....
MVs/Para.BRA/30.10/2	R.....I.....G.....G.....
MVs/SaoPaulo.BRA/5.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/Matogrossodosul.BRA/10.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/RioGrandedoSul.BRA/13.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/RioGrandedoSul.BRA/14.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/RiodeJaneiro.BRA/17.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/RioGrandedoSul.BRA/16.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11/1	R.....I.....G.....G.....
MVs/DistritoFederal.BRA/18.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/RioGrandedoSul.BRA/20.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/SaoPaulo.BRA/21.11/1	R.....I.....G.....G.....
MVs/SaoPaulo.BRA/21.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/RioGrandedoSul.BRA/19.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/RiodeJaneiro.BRA/22.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/RioGrandedoSul.BRA/17.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/RioGrandedoSul.BRA/23.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/SaoPaulo.BRA/32.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/SaoPaulo.BRA/34.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/SaoPaulo.BRA/37.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/SaoPaulo.BRA/37.11/1	R.....I.....G.....G.....
MVs/SaoPaulo.BRA/40.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/SaoPaulo.BRA/37.11/2	R.....I.....G.....G.....
MVs/MinasGerais.BRA/41.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/SaoPaulo.BRA/42.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/SaoPaulo.BRA/41.11	R.....I.....G.....G.....
MVs/SaoPaulo.BRA/39.11	R.....I.....G.....G.....

MVs/SaoPaulo.BRA/51.11R.....I.....G.....G.....
MVs/Pernambuco.BRA/2.12R.....I.....G.....G.....
	455 465 475 485 495 505 515
Schwarz_vaccine	GPSRASDARA AHLPTGTPLD IDTATESSQD PQDSRRSADA LLRLQAMAGI SEEQGSDDTDT PIVYNDNRLL D*
Mvi/Montreal.CAN/0.89/	.S.....S.....S.G.....L.....I.R...KD..
MVs/SantaCatarina.BRA/50.03	.S.....IS.....S.G.....L.....- - - - -
MVs/SantaCatarina.BRA/48.03	.S.....IS.....S.G.....L.....- - - - -
MVs/Bahia.BRA/43.06	.S...G....LIS.P...S.G.....L.....I SR...KD--
MVs/Bahia.BRA/45.06	.S...G....LIS.P...S.G.....L.....I SR...KD--
MVs/Bahia.BRA/45.06/2	.S...G....LIS.P...S.G.....L.....I SR...K---
MVs/Bahia.BRA/46.06	.S...G....LIS.P...S.G.....L.....I SR...KD--
MVs/Bahia.BRA/46.06/2	.S...G....LIS.P...S.G.....L.....I SR...KD--
MVs/Bahia.BRA/46.06/3	.S...G....LIS.P...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/Bahia.BRA/51.06	.S...G....LIS.P...S.G.....L.....- - - - -
MVs/Para.BRA/30.10	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/Para.BRA/30.10/2	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/SaoPaulo.BRA/5.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/Matogrossodosul.BRA/10.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/RioGrandedoSul.BRA/13.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/RioGrandedoSul.BRA/14.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/RiodeJaneiro.BRA/17.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/RioGrandedoSul.BRA/16.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11/1	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/DistritoFederal.BRA/18.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/RioGrandedoSul.BRA/20.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/SaoPaulo.BRA/21.11/1	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/SaoPaulo.BRA/21.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/RioGrandedoSul.BRA/19.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/RiodeJaneiro.BRA/22.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/RioGrandedoSul.BRA/17.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/RioGrandedoSul.BRA/23.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/SaoPaulo.BRA/32.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/SaoPaulo.BRA/34.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/SaoPaulo.BRA/37.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/SaoPaulo.BRA/37.11/1	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/SaoPaulo.BRA/40.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/SaoPaulo.BRA/37.11/2	.S....V...IS...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/MinasGerais.BRA/41.11	.S....V...IS...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/SaoPaulo.BRA/42.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/SaoPaulo.BRA/41.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/SaoPaulo.BRA/39.11	.S....V...IS...V...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/SaoPaulo.BRA/51.11	.S....V...IS...S.G.....L.....I SR...KD..
MVs/Pernambuco.BRA/2.12	.S....V...IS.L.V...S.G.....L.....I SR...KD..

A sequência Schwarz vacinal foi utilizada como referência para identificar a localização dos resíduos de aminoácidos que sofreram substituições (Tabela 5-2), em particular, à região entre os aminoácidos 457-476, que foi descrita como um dos três sítios antigênicos (Buckland, Giraudon et al. 1989). Nessa região foi possível identificar as alterações T469I e G470S em todas as sequências aqui analisadas. Identificamos também as alterações S460G, P468L e L473P nas sequências do ano de 2006. As alterações A462V e I475V foram observadas somente nas sequências dos anos de 2010, 2011 e 2012. A alteração P472L foi somente identificada na amostra do ano de 2012. Foi ainda possível identificar a alteração N522D, e este resíduo de aminoácido foi

relacionado com o hsp72 (Zhang *et al.*, 2005) que promove a síntese de RNA e a propagação do vírus do sarampo (Carsillo *et al.*, 2006)

Tabela 5- 2: Substituições nos resíduos de aminoácidos (região C-terminal da proteína N) nas sequências analisadas do vírus do sarampo do genótipo D4 circulante durante os anos de 2003, 2006, 2010, 2011 e 2012, em relação à sequência vacinal Schwarz

Amostras	Resíduos de aminoácidos																						
	405	420	431	434	443	451	456	460	462	468	469	470	472	473	475	479	482	505	514	515	516	521	522
Schwarz_vaccine	K	L	R	G	S	Y	P	S	A	P	T	G	P	L	I	T	S	S	T	P	I	R	N
MVs/SantaCatarina.BRA/50.03	R	I	G	S	G		S				I	S				S	G	L	-	-	-	-	-
MVs/SantaCatarina.BRA/847.03	R	I	G	S	G		S				I	S				S	G	L	-	-	-	-	-
MVs/Bahia.BRA/43.06	R	I	G		G	H	S	G		L	I	S		P		S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/Bahia.BRA/45.06	R	I	G		G	H	S	G		L	I	S		P		S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/Bahia.BRA/45.06/2	R	I	G		G	H	S	G		L	I	S		P		S	G	L	I	S	R	K	-
MVs/Bahia.BRA/46.06	R	I	G		G	H	S	G		L	I	S		P		S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/Bahia.BRA/46.06/2	R	I	G		G	H	S	G		L	I	S		P		S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/Bahia.BRA/46.06/3	R	I	G		G	H	S	G		L	I	S		P		S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/Bahia.BRA/51.06	R	I	G		G	H	S	G		L	I	S		P		S	G	L	-	-	-	-	-
MVs/Para.BRA/30.10	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/Para.BRA/30.10/2	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/SaoPaulo.BRA/5.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/Matogrossodosul.BRA/10.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/RioGrandedoSul.BRA/13.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/RioGrandedoSul.BRA/14.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/RiodeJaneiro.BRA/17.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/RioGrandedoSul.BRA/16.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11/1	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/DistritoFederal.BRA/18.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/RioGrandedoSul.BRA/20.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/SaoPaulo.BRA/21.11/1	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/SaoPaulo.BRA/21.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/RioGrandedoSul.BRA/19.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/RiodeJaneiro.BRA/22.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/RioGrandedoSul.BRA/17.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/RioGrandedoSul.BRA/23.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/SaoPaulo.BRA/32.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/SaoPaulo.BRA/34.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/SaoPaulo.BRA/37.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/SaoPaulo.BRA/37.11/1	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/SaoPaulo.BRA/40.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/SaoPaulo.BRA/37.11/2	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/MinasGerais.BRA/41.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/SaoPaulo.BRA/42.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/SaoPaulo.BRA/41.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/SaoPaulo.BRA/39.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/SaoPaulo.BRA/51.11	R	I	G		G		S		V		I	S			V	S	G	L	I	S	R	K	D
MVs/Pernambuco.BRA/2.12	R	I	G		G		S		V		I	S	L		V	S	G	L	I	S	R	K	D

Sequências compostas por aproximadamente 150 aminoácidos pertencentes ao gene N do vírus do sarampo genótipo D4. A numeração usada foi determinada a partir do primeiro aminoácido do gene N completo da sequência da cepa vacinal Schwarz. D=Ácido aspártico; S=Serina; E=Ácido glutâmico;

T=Triónima; G=Glicina; V=Valina; K=Lisina; P=Prolina; N=Asparagina; F=Fenilalanina; L=Leucina; H=Histidina; R=Arginina; A=Alanina; I=Isoleucina; Q=Glutamina; Y=Tirosina

Foi feita uma comparação entre as sequências brasileiras da região C-terminal do gene N com a sequência referência para o genótipo D4 (Figura 5-3).

Tabela 5-3: Substituições nos resíduos de aminoácidos nas sequências (proteína N) analisadas do vírus do sarampo do genótipo D4 circulante durante os anos de 2003, 2006, 2010, 2011 e 2012, em relação à sequência referência para o genótipo D4 (MVi/Montreal.CAN/89)

Amostras	Resíduos de aminoácidos										
	434	443	451	460	462	468	469	472	473	475	515
MVi/Montreal.CAN/0.89	G	S	Y	S	A	P	T	P	L	I	P
MVs/SantaCatarina.BRA/50.03	S	G					I				-
MVs/SantaCatarina.BRA/847.03	S	G					I				-
MVs/Bahia.BRA/43.06		G	H	G		L	I		P		S
MVs/Bahia.BRA/45.06		G	H	G		L	I		P		S
MVs/Bahia.BRA/45.06/2		G	H	G		L	I		P		S
MVs/Bahia.BRA/46.06		G	H	G		L	I		P		S
MVs/Bahia.BRA/46.06/2		G	H	G		L	I		P		S
MVs/Bahia.BRA/46.06/3		G	H	G		L	I		P		S
MVs/Bahia.BRA/51.06		G	H	G		L	I		P		-
MVs/Para.BRA/30.10		G			V		I			V	S
MVs/Para.BRA/30.10/2		G			V		I			V	S
MVs/SaoPaulo.BRA/5.11		G			V		I			V	S
MVs/Matogrossodosul.BRA/10.11		G			V		I			V	S
MVs/RioGrandedoSul.BRA/13.11		G			V		I			V	S
MVs/RioGrandedoSul.BRA/14.11		G			V		I			V	S
MVs/RiodeJaneiro.BRA/17.11		G			V		I			V	S
MVs/RioGrandedoSul.BRA/16.11		G			V		I			V	S
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11		G			V		I			V	S
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11/1		G			V		I			V	S
MVs/DistritoFederal.BRA/18.11		G			V		I			V	S
MVs/RioGrandedoSul.BRA/20.11		G			V		I			V	S
MVs/SaoPaulo.BRA/21.11/1		G			V		I			V	S
MVs/SaoPaulo.BRA/21.11		G			V		I			V	S
MVs/RioGrandedoSul.BRA/19.11		G			V		I			V	S
MVs/RiodeJaneiro.BRA/22.11		G			V		I			V	S
MVs/RioGrandedoSul.BRA/17.11		G			V		I			V	S
MVs/RioGrandedoSul.BRA/23.11		G			V		I			V	S
MVs/SaoPaulo.BRA/32.11		G			V		I			V	S
MVs/SaoPaulo.BRA/34.11		G			V		I			V	S
MVs/SaoPaulo.BRA/37.11		G			V		I			V	S
MVs/SaoPaulo.BRA/37.11/1		G			V		I			V	S
MVs/SaoPaulo.BRA/40.11		G			V		I			V	S
MVs/SaoPaulo.BRA/37.11/2		G			V		I				S
MVs/MinasGerais.BRA/41.11		G			V		I				S
MVs/SaoPaulo.BRA/42.11		G			V		I			V	S
MVs/SaoPaulo.BRA/41.11		G			V		I			V	S
MVs/SaoPaulo.BRA/39.11		G			V		I			V	S
MVs/SaoPaulo.BRA/51.11		G			V		I				S
MVs/Pernambuco.BRA/2.12		G			V		I	L		V	S

Sequências compostas por aproximadamente 150 aminoácidos pertencentes ao gene N do vírus do sarampo genótipo D4. A numeração usada foi determinada a partir do primeiro aminoácido do gene N

completo da sequência da cepa vacinal Schwarz. S=Serina; T=Triónima; G=Glicina; V=Valina; P=Prolina; L=Leucina; H=Histidina; A=Alanina; I=Isoleucina; Q=Glutamina; Y=Tirosina

Ao comparar-se as duas sequências do ano de 2003 com a sequência referência para o genótipo D4 (Montreal-D4), observou-se a substituição G434S. Esta substituição só foi encontrada nestas amostras em relação as demais sequências brasileiras analisadas neste trabalho. Apenas na sequência do ano de 2012 foi identificada a substituição P472L (Tabela 5-3). As substituições identificadas nas sequências brasileiras (quando comparadas às cepas de referência Schwarz e Montreal) foram observadas em outras sequências do genótipo D4 circulantes no mundo.

As amostras brasileiras do genótipo D4 agruparam-se entre si e por ano. Após uma análise no BLAST (ferramenta do GenBank), notou-se que algumas amostras eram próximas às circulantes na Europa, Índia e Estados Unidos (Tabelas 5-4 à 5-8).

Tabela 5-4: Mutações identificadas nas amostras Brasileiras do genótipo D4 (região C-terminal da proteína N) do ano de 2003 em relação a amostras da Europa do mesmo ano.

Amostras	Sequências similares			Mutações
	Pais	Ano	Nome	
MVs/SantaCatarina.BRA/50.03	Croácia	2003	MV.s.Zagreb.HRV.48.03	NI
MVs/SantaCatarina.BRA/48.03				
NI – Não identificada				

Tabela 5-5: Mutações identificadas nas amostras Brasileiras do genótipo D4 (região C-terminal da proteína N) do ano de 2006 em relação a amostras da Europa e Índia.

Amostras	Sequências similares			Mutações
	Pais	Ano	Nome	
MVs/Bahia.BRA/43.06	Polônia	2006	MVi/Warsaw.POL/28.06	NI
MVs/Bahia.BRA/45.06				
MVs/Bahia.BRA/45.06/2	Índia	2007	MV.s/VALSAD.IND/17.10/7	
MVs/Bahia.BRA/46.06				
MVs/Bahia.BRA/46.06/2	Canada	2007	MVi/Quebec.CAN/38.07	
MVs/Bahia.BRA/46.06/3				
MVs/Bahia.BRA/51.06				
MVs/Bahia.BRA/43.06				
MVs/Bahia.BRA/45.06				
MVs/Bahia.BRA/45.06/2				
MVs/Bahia.BRA/46.06				
MVs/Bahia.BRA/46.06/2				

As sequências MVi/Warsaw.POL/28.06, MVs/VALSAD.IND/17.10/7 e MVi/Quebec.CAN/38.07 são idênticas entre si em termos de percentual de divergência de aminoácidos. NI – Não identificada

As sequências MVs/Para.BRA/30.10 e Mvs/Para.BRA/30.10/2 quando comparadas em termos de percentual de divergência de aminoácidos foram idênticas entre si e às sequências que se aproximaram a elas após o BLAST, exceto com a “Enfield”, como podemos observar na Tabela 5-6.

Tabela 5-6: Mutações identificadas nas amostras Brasileiras do genótipo D4 (região C-terminal da proteína N) do ano de 2010 em relação a amostras da Europa e América.

Amostras	Sequências Similares			Mutações
	Pais	Ano	Nome	
MVs/Para.BRA/30.10	Inglaterra	2009	Manchester.GBR/10.09	NI
	Switzerland	2010	Geneva.CHE/16.10/	NI
	Inglaterra	2007	MVs/Enfield.GBR/14.07/	V462A
	Inglaterra	2010	MVs/London.GBR/16.10/2	NI
MVs/Para.BRA/30.10/2	Canada	2011	MVs/Quebec.CAN/17.11/6D4	NI
	Itália	2011	MVs/Venice.ITA/19.11/2	NI
	Grécia	2011	MVs/Athens.GRC/15.11D4	NI
	Chile	2011	MVs/Santiago.CHL/17.2011D4	NI

NI – Não identificada

Tabela 5-7: Mutações identificadas nas amostras Brasileiras do genótipo D4 (região C-terminal da proteína N) do ano de 2011 em relação a amostras da Europa.

Amostras	Sequências similares			Mutações
	Pais	Ano	Nome	
MVs/SaoPaulo.BRA/5.11				NI
MVs/Matogrossodosul.BRA/10.11				NI
MVs/RioGrandedoSul.BRA/13.11				NI
MVs/RioGrandedoSul.BRA/14.11				NI
MVs/RiodeJaneiro.BRA/17.11				NI
MVs/RioGrandedoSul.BRA/16.11				NI
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11				NI
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11/1				NI
MVs/DistritoFederal.BRA/18.11				NI
MVs/RioGrandedoSul.BRA/20.11				NI
MVs/SaoPaulo.BRA/21.11/1	Switz.	2010	MVs/Geneva.CHE/16.10/	NI
MVs/SaoPaulo.BRA/21.11	Inglaterra	2009	MVs/Manchester.GBR/10.09	NI
MVs/RioGrandedoSul.BRA/19.11	Inglaterra	2010	MVs/London.GBR/16.10/2	NI
MVs/RiodeJaneiro.BRA/22.11	Canadá	2011	MVs/Quebec.CAN/17.11/6D4	NI
MVs/RioGrandedoSul.BRA/17.11	Itália	2011	MVs/Venice.ITA/19.11/2	NI
MVs/RioGrandedoSul.BRA/23.11	Chile	2011	MVs/Santiago.CHL/17.2011D4	NI
MVs/SaoPaulo.BRA/32.11	Grécia	2011	MVs/Athens.GRC/15.11D4	NI
MVs/SaoPaulo.BRA/34.11				NI
MVs/SaoPaulo.BRA/37.11				NI
MVs/SaoPaulo.BRA/37.11/1				NI
MVs/SaoPaulo.BRA/40.11				NI
MVs/SaoPaulo.BRA/37.11/2				V475I
MVs/MinasGeraiis.BRA/41.11				V475I
MVs/SaoPaulo.BRA/42.11				NI
MVs/SaoPaulo.BRA/41.11				NI
MVs/SaoPaulo.BRA/39.11				NI
MVs/SaoPaulo.BRA/51.11				V475I

NI – Não identificada

Tabela 5-8: Mutações identificadas nas amostras Brasileiras do genótipo D4 (região C-terminal da proteína N) do ano de 2012 em relação a amostras da Europa e dos Estados Unidos.

Amostras	Sequências similares			Mutações
	Pais	Ano	Nome	
MVs/Pernambuco.BRA/2.12	França	2011	MVs/Marmande.FRA/43.11/2	NI
	Inglaterra	2010	MVs/London.GBR/16.10/2	NI
	EUA	2012	MVs/New-York.USA/1.12/1D4	NI
	Inglaterra	2010	MVs/London.GBR/16.10/2	L472P
	Colômbia	2012	MVs/Bogota.COL/5.12/D4	NI
	Irlanda	2012	MVs/Kildare.IRL/36.12/D4	NI

NI – Não identificada

No período de 2010 a 2011, muitas variantes da sequência MVs/Enfield.GBR/14.07, pertencentes ao genótipo D4, circularam na Europa (WHO, 2011). Foi ainda possível observar que as sequências brasileiras de 2010, 2011 e 2012 encontram-se relacionadas à sequência “Enfield”. Observamos que as sequências MVs/SaoPaulo.BRA/37.11/2, MVs/MinaGeraias.BRA/41.11, MVs/SaoPaulo.BRA/51.11 agruparam-se num mesmo ramo, distanciando-se das demais amostras do mesmo ano. Podemos inferir que, tanto essas sequências quanto a MVs/Pernambuco.BRA/2.12 podem ter resultado de importações de variantes “Enfield” a partir da região europeia. Entretanto, existem evidências de sequências bastante similares às citadas acima em outras partes do continente americano.

As sequências de 2010 e as demais amostras de 2011 são idênticas à MVs/Manchester.GBR/14.09, uma variante da sequência “Enfield” que contém cerca de 1558 representantes na Europa, que foram isoladas predominantemente na região da Europa. Existem vários grupos de sequências “Manchester-like” em outras regiões do mundo, exceto na África (Comunicação pessoal Myers R. e Brown D.(Brown & Myers 2012). Após o alinhamento da sequência MVs/Enfield.GBR/14.07 com as amostras brasileiras de 2010 e 2011, evidenciamos a alteração A462V.

5.4. Padronização da reação de RT-PCR para o gene H completo

Os resultados obtidos nas reações de RT-PCR para amplificação do fragmento gênico H completo, indicaram que o uso dos iniciadores reversos específicos (H6 e H2) a 25pmol/μL, descritos por Kessler et al 2011, na síntese de cDNA foi mais eficiente, conseguindo amplificar todos os quatro fragmentos desejados, mostrados na Figura 5-6. Salientamos que esta padronização foi realizada apenas para as amostras dos anos de

2003 e 2006, por serem as amostras mais antigas em análise neste trabalho. Os iniciadores randômicos (*Random hexamer primer* – Invitrogen, USA), a 0.03µg/µL não foram capazes de amplificar nenhum dos fragmentos testados. Estes iniciadores randômicos, a 3µg/µL, amplificaram apenas dois fragmentos testados e geraram muitas bandas inespecíficas, como ilustrado na Figura 5-7.

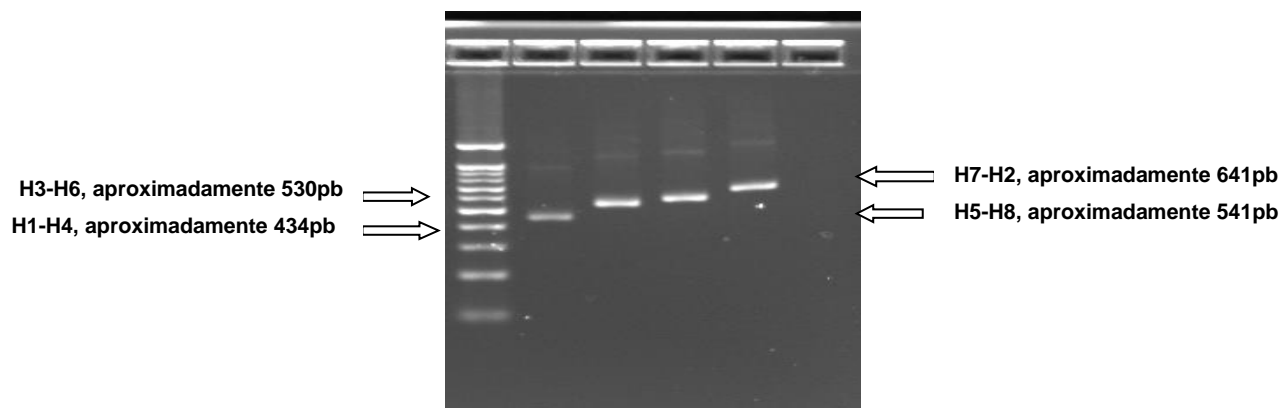


Figura 5- 3: Gel de agarose a 2% após eletroforese, apresentando os produtos obtidos na reação de RT-PCR no protocolo estabelecido com o uso de iniciadores reversos específicos na reação de cDNA.

Dentre os 39 casos positivos para o vírus do sarampo genótipo D4 previamente identificados pela amplificação do fragmento N, apenas 37 apresentaram quantidade de material suficiente para serem submetidos à amplificação do fragmento H completo. Desses, somente 17 casos foram positivos. A relação entre o número de amostras positivas e o total de amostras testadas de acordo com o tipo de espécimes clínicos foi 10/30 para URN, 13/34 para SNF e 1/10 para LNF (Tabela 5-9).

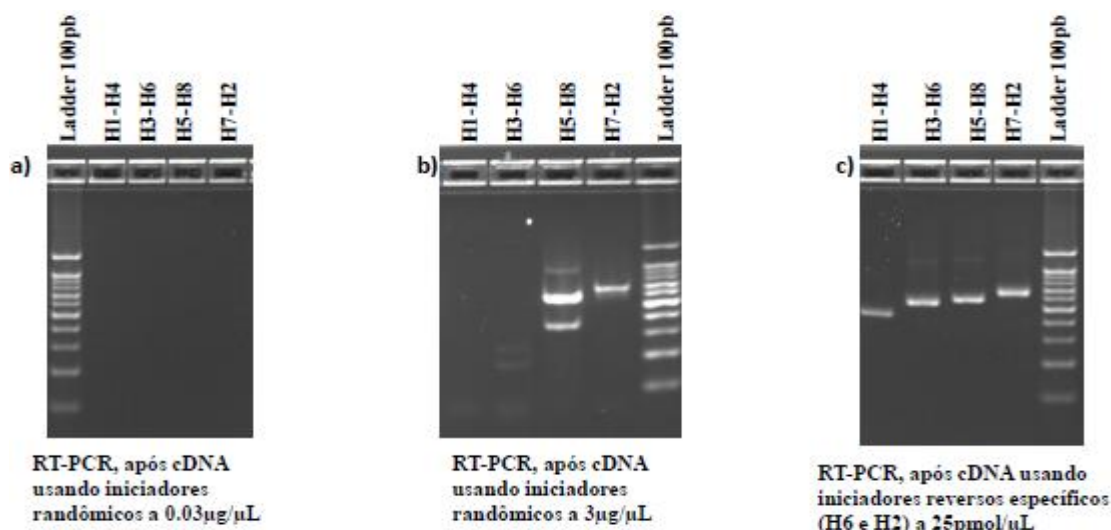


Figura 5-4: Gel de agarose a 2% após eletroforese, apresentado os produtos obtidos na reação de RT-PCR dos fragmentos gênicos do gene H completo, em três condições diferentes.

Aplicamos 5µL das amostras usadas durante a padronização do ensaio. Em a) nenhum dos fragmentos foi amplificado. b) com o uso de iniciadores randômicos à 3µg/µL na reação de cDNA seguida da reação de RT-PCR, dois fragmentos do gene H foram amplificados. E em c) ocorreu a amplificação de todos os fragmentos do gene H completo na reação de RT-PCR após a síntese do cDNA usando iniciadores reversos específicos (H6 e H2).

Tabela 5-9: Espécimes que obtiveram resultado positivo na detecção do RNA viral pela amplificação do gene H completo e posterior sequenciamento

Espécime	Identificação/LVRS*	Procedência/UF	Nome da sequência
SNF	838/03	Santa Catarina/SC	MVs/SantaCatarina.BRA/50.03
	846/06	Bahia/BA	MVs/Bahia.BRA/46.06/2
	36/11	Mato Grosso do Sul/MS	MVs/MatoGrossodoSul: BRA/10.11
	50/11	Rio Grande do Sul/RS	MVs/RioGrandedoSul.BRA/14.11
	52/11	Rio de Janeiro/RJ	MVs/RiodeJaneiro.BRA/17.11
	54/11	Rio Grande do Sul/RS	MVs/RioGrandedoSul.BRA/16.11
	60/11	Rio de Janeiro/RJ	MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11/1
	75/11	Rio Grande do Sul/RS	MVs/RioGrandedoSul.BRA/20.11
	88/11	Rio Grande do Sul/RS	-
	103/11	Rio Grande do Sul/RS	MVs/RioGrandedoSul.BRA/23.11
	246/11	Minas Gerais/MG	MVs/MinasGerais.BRA/41.11
	300/11	São Paulo/SP	MVs/SãoPaulo.BRA/42.11
	22/12	Pernambuco/PE	MVs/Pernambuco.BRA/2.12
	URN	846/06	Bahia/BA
132/10		Pará/PA	MVs/Pará.BRA/30.10/2
36/11		Mato Grosso do Sul/MS	MVs/MatoGrossodoSul: BRA/10.11
45/11		Rio Grande do Sul/RS	MVs/RioGrandedoSul.BRA/13.11
59/11		Rio de Janeiro/RJ	MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11
65/11		Distrito Federal/DF	-
103/11		Rio Grande do Sul/RS	MVs/RioGrandedoSul.BRA/23.11
246/11		Minas Gerais/MG	MVs/MinasGerais.BRA/41.11
300/11		São Paulo/SP	MVs/SãoPaulo.BRA/42.11
22/12	Pernambuco/PE	MVs/Pernambuco.BRA/2.12	
LNF	300/11	São Paulo/SP	

*Identificação usada no LVRS, que é dada as amostras ao chegarem ao laboratório.

SNF – secreção nasofaríngea, URN – Urina, LNF – Linfócitos

5.5. Sequenciamento e análise filogenética da Hemaglutinina (gene H completo).

As 14 sequências do gene H completo, obtidas a partir das amostras brasileiras neste trabalho foram analisadas e a árvore filogenética está representada na Figura 5-7, evidenciando que as amostras analisadas pertencem ao genótipo D4, confirmando os resultados obtidos pela análise das sequências da região C-terminal da proteína N.

Na sequência MVs/Bahia.BRA/46.06 foi identificada a presença de uma base degenerada (C/T) na posição 336. Nesta posição era esperado um resíduo de timina (T) com base na referência para o genótipo D4 MVi/Montreal.CAN/89. Esta alteração não acarreta mudança de aminoácido (treonina). Similarmente, a sequência MVs/Para.BRA/30.10/2 na posição 1800, apresentou uma base degenerada (A/G), nesta posição a sequência Montreal apresenta um resíduo de guanina. Neste caso também não foi verificada alteração do aminoácido (valina).

Quando comparada com a sequência referência para o genótipo D4 MVi/Montreal.CAN/89, a sequência do ano de 2003 coletada no estado de Santa Catarina apresentou um percentual de divergência de nucleotídeos de 1,3%, para a sequência de 2006 coletada no estado da Bahia o percentual de divergência foi de 1,2%.

As sequências do gene H completo dos anos de 2010, 2011 e 2012 quando comparadas com a sequência MVi/Montreal.CAN/89 apresentaram uma divergência de 1,8%, a exceção da sequência MVs/RiodeJaneiro.BRA/42.11 e MVs/Pernambuco.BRA/2.12 pois ambas apresentaram 1,7% de divergência de nucleotídeos.

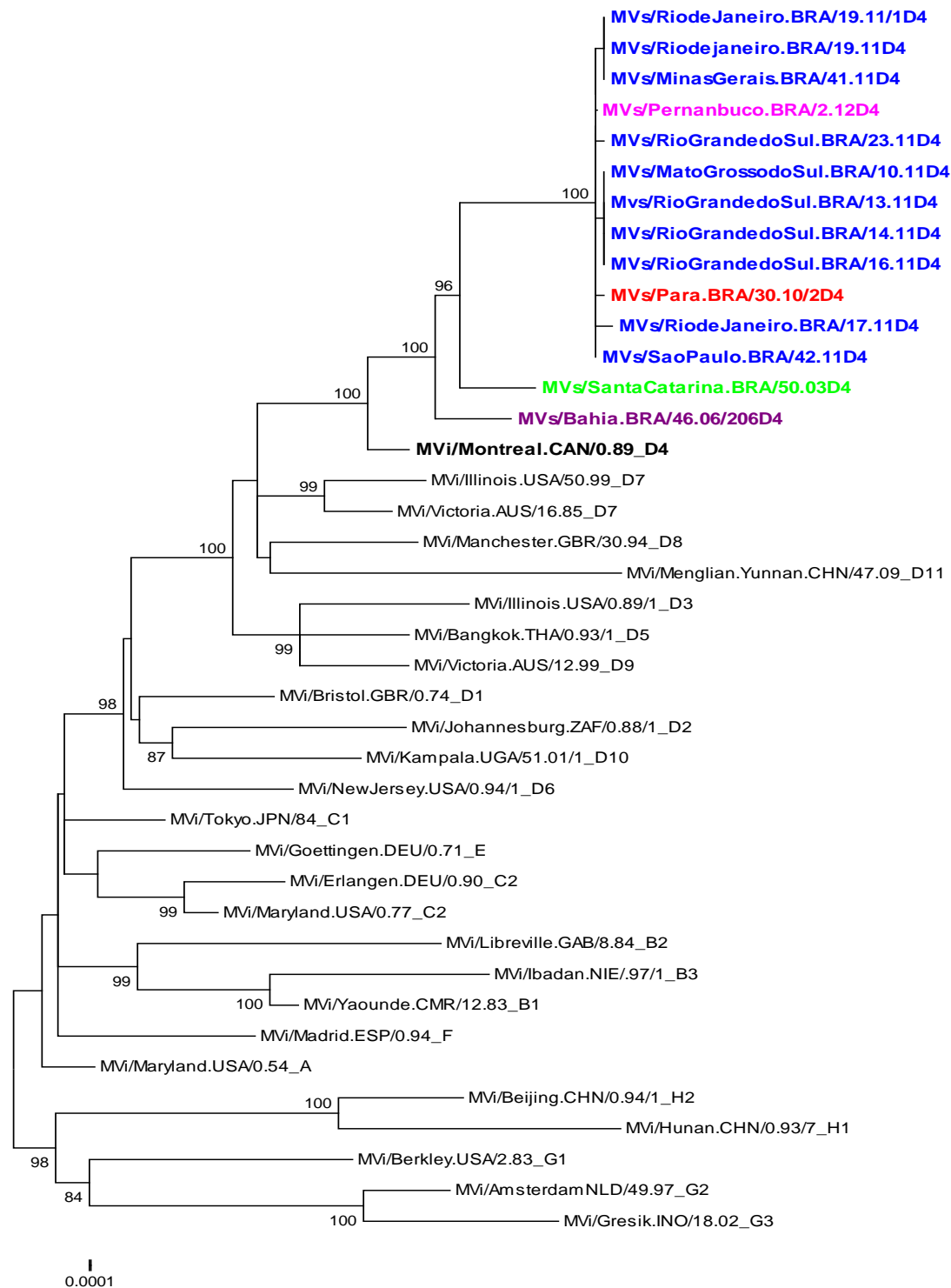


Figura 5- 5: Relação filogenética das amostras do vírus do sarampo (gene H completo) do genótipo D4 circulantes no Brasil em 2003, 2006, 2010, 2011 e 2012 e as cepas referência dos principais genótipos.

Árvore filogenética inferida pelo método de Máxima verossimilhança. Os valores de *bootstrap*, acima de 80% encontram-se indicados próximos aos ramos. As distâncias evolucionárias foram calculadas com base no modelo *kimura-2-parâmetros*. A taxa de variação entre as posições foi modelada com a *distribuição gamma*. Os anos das coletas das amostras deste estudo estão evidenciados em cores diferentes para cada ano 2003 cor verde, 2006 cor púrpura, 2010 cor vermelha e 2012 cor lilás. Sequências das cepas referência dos principais genótipos já descritos para o vírus do sarampo e reconhecidos pela OMS

5.6. Análise da variabilidade na sequência completa do gene H

As 14 sequências obtidas neste trabalho, foram alinhadas com a amostra vacinal Schwarz e a amostra referência Montreal-D4 e encontram-se representadas na Tabela 5-10. A partir do referido alinhamento, acrescentando as amostras D4 circulantes no mundo, construímos a árvore filogenética ilustrada na Figura 5-8. Ao construirmos as árvores filogenéticas foi observado que poucas sequências completas do gene H encontravam-se disponíveis no *GenBank*, o que limitou nossas análises.

A partir da árvore filogenética apresentada na Figura 5-8, observamos que os diversos casos de sarampo detectados no Brasil nos anos de 2003, 2006, 2010, 2011 e 2012 encontram-se relacionados a várias fontes de importação, e que as sequências que mais se aproximaram das sequências brasileiras eram provenientes dos EUA e de vários países da Europa, apesar de terem sido identificadas em anos diferentes.

Em 2003, as amostras MVs/SantaCatarina.BRA/50.03 se agruparam no mesmo ramo com a sequência MVs/Zagreb.HRV.48.03, da qual era idêntica, apresentando um *bootstrap* de 100.

A sequência MVs/Bahia.BRA/46.06/2 agrupou-se num ramo isolado na árvore (Figura 5-8). Foi possível observar que as outras sequências dos anos 2006 e 2007, disponíveis no GenBank até o momento desta análise, apresentaram um percentual de divergência de 1,3%-1,8% em relação a MVs/Bahia.BRA/46.06/2.

Em 2010, a amostra MVs/Para.BRA/30.10/2, coletada no Pará, se agrupou num ramo isolado na árvore e apresentou um percentual de divergência de 0,1% com a sequência MVs/Geneva.CHE/16.10, agrupando-se bem próxima a essa.

As sequências MVs/Riode Janeiro.BRA/19.11/1, MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11 e MVs/MinasGerais.BRA/41.11 foram idênticas entre si. Essas sequências, quando comparadas a sequência referência Mvi/Montreal.CAN/89 apresentaram uma alteração no resíduo de aminoácido K460R, não sendo identificado em mais nenhuma sequência aqui analisada. Isto provavelmente fez com que elas se agrupassem entre si, distanciando-se das demais sequências analisadas.

Similarmente, as sequências do ano de 2011, MVs/RioGrandedoSul.Bra/13.11, MVs/RioGrandedoSul.Bra/14.11, MVs/RioGrandedoSul.Bra/16.11 e MVs/MatoGrossoSul.BRA/10.11 foram idênticas entre si quando analisadas pela divergência de nucleotídeos. Quando comparadas com a sequência referência apresentaram uma alteração no resíduo de aminoácido S241G, que foi somente identificada nessas sequências. Da mesma forma, esta alteração pode ter contribuído para que elas se agrupassem entre si, distanciando-se das demais sequências analisadas (Figura 5-8).

A sequência MVs/Pernambuco.BRA/2.12 e MVs/SaoPaulo.BRa/42.11 foram idênticas a sequência MVs/Geneva.CHE/16.10, tendo essas se agrupado no mesmo ramo na árvore (Figura 5-8).

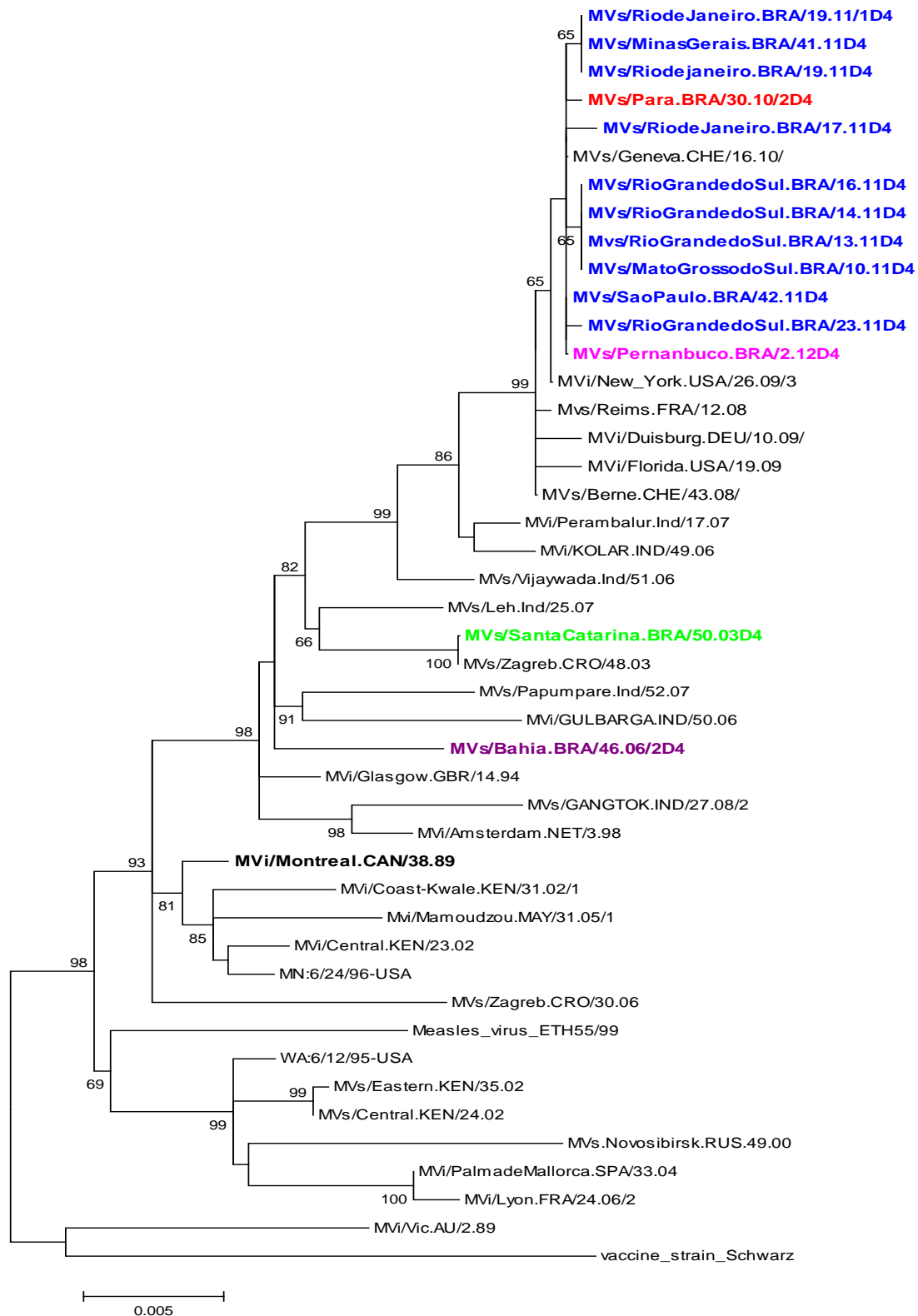


Figura 5-6: Relação filogenética das amostras do vírus do sarampo (gene H completo) do genótipo D4 circulantes no Brasil em 2003, 2006, 2010, 2011 e 2012 e as cepas circulantes no mundo.

Árvore filogenética inferida pelo método de Máxima verossimilhança. Os valores de *bootstrap*, acima de 60% encontram-se indicados próximos aos ramos. As distâncias evolucionárias foram calculadas com base no modelo *kimura-2-parâmetros*. A taxa de variação entre as posições foi modelada com a *distribuição gamma*. Os anos das coletas das amostras deste estudo estão evidenciados em cores diferentes, 2003 cor verde, 2006 cor púrpura, 2010 cor vermelha e 2012 cor lilás.

Tabela 5-10: Alinhamento de aminoácidos das 14 seqüências do gene H completo do vírus do sarampo, com a cepa vacinal Schwarz e a cepa Montreal referência para o genótipo D4.

O * representa o códon de parada da proteína.

	1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101
Schwarz_1994	MSPQRDRINA	FYKDNPHPKG	SRIVINREHL	MIDRPYVLLA	VLVFMFLSLI	GLLAIAGIRL	HRAAIYTAEI	HKSLSTNLDV	TNSIEHQVKD	VLTPLFKIIG	DEVGLRTPQR
MVi/Montreal.CAN/89
MVs/SantaCatarina.BRA/50.03
MVs/Bahia.BRA/46.06/2
MVs/Para.BRA/30.10/2
MVs/MatoGrossodoSul.BRA/10.11
Mvs/RioGrandedoSul.BRA/13.11
MVs/RioGrandedoSul.BRA/14.11
MVs/RioGrandedoSul.BRA/16.11
MVs/RiodeJaneiro.BRA/17.11
MVs/Riodejaneiro.BRA/19.11
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11/1
MVs/RioGrandedoSul.BRA/23.11
MVs/MinasGerais.BRA/41.11
MVs/SaoPaulo.BRA/42.11
MVs//Pernanbuco.BRA/2.12
	111	121	131	141	151	161	171	181	191	201	211
Schwarz_1994	FTDLVKLISD	KIKFLNPDRE	YDFRDLTWCI	NPPERIKLDY	DQYCADVAAE	ELMNALVNST	LLETRTTNQF	LAVSKGNCSSG	PTTIRGQFSN	MSLSLLLDLYL	GRGYNVSSIV
MVi/Montreal.CAN/89F.....A.A.....S.....
MVs/SantaCatarina.BRA/50.03F.....A.A.....SQ.....
MVs/Bahia.BRA/46.06/2F.....A.A.....SQ.....
MVs/Para.BRA/30.10/2F.....A.A.....SQ.....
MVs/MatoGrossodoSul.BRA/10.11F.....A.A.....SQ.....
Mvs/RioGrandedoSul.BRA/13.11F.....A.A.....SQ.....
MVs/RioGrandedoSul.BRA/14.11F.....A.A.....SQ.....
MVs/RioGrandedoSul.BRA/16.11F.....A.A.....SQ.....
MVs/RiodeJaneiro.BRA/17.11F.....A.A.....SQ.....
MVs/Riodejaneiro.BRA/19.11F.....A.A.....SQ.....
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11/1F.....A.A.....SQ.....
MVs/RioGrandedoSul.BRA/23.11F.....A.A.....SQ.....
MVs/MinasGerais.BRA/41.11F.....A.A.....SQ.....
MVs/SaoPaulo.BRA/42.11F.....A.A.....SQ.....
MVs//Pernanbuco.BRA/2.12F.....A.A.....SQ.....

	221	231	241	251	261	271	281	291	301	311	321
Schwarz_1994	TMTSQGMYGG	TYLVEKPNLS	SKRSELSQLS	MYRVFEVGV	RNPGLGAPVF	HMTNYLEQPV	SNLNSNCMVA	LGELKLAALC	HGEDSITIPY	QGSKGVSFQ	LVKLGWVWSP
MVi/Montreal.CAN/89G.....	.H.....F....	..F.....F....	.R.....
MVs/SantaCatarina.BRA/50.03G....P.	.H.....F....	..F.....F....	.R.....
MVs/Bahia.BRA/46.06/2G....P.	.H.....F....	..F.....F....	.R.....
MVs/Para.BRA/30.10/2N .G....P.	.H.....F....	..F.....F....	.RG.....A...
MVs/MatoGrossodoSul.BRA/10.11N G.G....P.	.H.....F....	..F.....F....	.RG.....A...
MVs/RioGrandedoSul.BRA/13.11N G.G....P.	.H.....F....	..F.....F....	.RG.....A...
MVs/RioGrandedoSul.BRA/14.11N G.G....P.	.H.....F....	..F.....F....	.RG.....A...
MVs/RioGrandedoSul.BRA/16.11N G.G....P.	.H.....F....	..F.....F....	.RG.....A...
MVs/RiodeJaneiro.BRA/17.11N .G....P.	.H.....F....	..F.....F....	.RG.....A...
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11N .G....P.	.H.....F....	..F.....F....	.RG.....A...
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11/1N .G....P.	.H.....F....	..F.....F....	.RG.....A...
MVs/RioGrandedoSul.BRA/23.11N .G....P.	.H.....F....	..F.....F....	.RG.....A...
MVs/MinasGerais.BRA/41.11N .G....P.	.H.....F....	..F.....F....	.RG.....A...
MVs/SaoPaulo.BRA/42.11N .G....P.	.H.....F....	..F.....F....	.RG.....A...
MVs//Pernanbuco.BRA/2.12N .G....P.	.H.....F....	..F.....F....	.RG.....A...

	331	341	351	361	371	381	391	401	411	421	431
Schwarz_1994	TDMQSWVPLS	TDDPVIDRLY	LSSHRGVIAD	NQAKWAVPTT	RTDDKLRMET	CFQQACKGKI	QALCENPEWA	PLKDNRIPSY	GVLSVDLSLT	VELKIKIASG	FGPLITHGSG
MVi/Montreal.CAN/89N...
MVs/SantaCatarina.BRA/50.03	P.....N...
MVs/Bahia.BRA/46.06/2L..N...
MVs/Para.BRA/30.10/2D..I..N...
MVs/MatoGrossodoSul.BRA/10.11D..I..N...
MVs/RioGrandedoSul.BRA/13.11D..I..N...
MVs/RioGrandedoSul.BRA/14.11D..I..N...
MVs/RioGrandedoSul.BRA/16.11D..I..N...
MVs/RiodeJaneiro.BRA/17.11D..K...I..N...
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11D..I..N...
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11/1D..I..N...
MVs/RioGrandedoSul.BRA/23.11D..I..N...
MVs/MinasGerais.BRA/41.11D..I..N...
MVs/SaoPaulo.BRA/42.11D..I..N...
MVs//Pernanbuco.BRA/2.12D..I..N...

	441	451	461	471	481	491	501	511	521	531	541
Schwarz_1994	MDLYKSNHNN	VYWLTIPPMMK	NLALGVINTL	EWIPRFKVSP	YLFTVPIKEA	GEDCHAPTYL	PAEVDGDVKL	SSNLVILPGQ	DLQYVLATYD	TSRVEHAVVY	YVYSPSRFS
Mvi/Montreal.CAN/89V.....	N.....
MVs/SantaCatarina.BRA/50.03V.....	N.....
MVs/Bahia.BRA/46.06/2V.....	N.....
MVs/Para.BRA/30.10/2V.....	D.....
MVs/MatoGrossodoSul.BRA/10.11V.....	D.....
Mvs/RioGrandedoSul.BRA/13.11V.....	D.....
MVs/RioGrandedoSul.BRA/14.11V.....	D.....
MVs/RioGrandedoSul.BRA/16.11V.....	D.....
MVs/RiodeJaneiro.BRA/17.11V.....	D.....
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11V.....	D.....
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11/1RV.....	D.....
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11/1RV.....	D.....
MVs/RioGrandedoSul.BRA/23.11V.....	D.....
MVs/MinasGerais.BRA/41.11RV.....	D.....
MVs/SaoPaulo.BRA/42.11V.....	D.....
MVs//Pernanbuco.BRA/2.12V.....	D.....

	551	561	571	581	591	601	611
Schwarz_1994	YFYPPRLPIK	GVPIELQVEC	FTWDQKLWCR	HFCVLADSES	GGHITHSGMV	GMGVSVCTVTR	EDGTNR*
Mvi/Montreal.CAN/89
MVs/SantaCatarina.BRA/50.03	S.R.....
MVs/Bahia.BRA/46.06/2
MVs/Para.BRA/30.10/2
MVs/MatoGrossodoSul.BRA/10.11
Mvs/RioGrandedoSul.BRA/13.11
MVs/RioGrandedoSul.BRA/14.11
MVs/RioGrandedoSul.BRA/16.11
MVs/RiodeJaneiro.BRA/17.11
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11/1
MVs/RioGrandedoSul.BRA/23.11
MVs/MinasGerais.BRA/41.11
MVs/SaoPaulo.BRA/42.11
MVs//Pernanbuco.BRA/2.12

As amostras brasileiras do genótipo D4 agruparam-se entre si e por ano. Após uma análise no BLAST (ferramenta do GenBank), notou-se que algumas amostras eram próximas às circulantes na Europa e na Índia (Tabelas 5-11 à 5-13).

Tabela 5-11: Mutações identificadas nas amostras brasileiras do genótipo D4 (proteína H) dos anos de 2006 em relação a amostras da Europa e Ásia.

Amostras	Sequências similares			Mutações
	País	Ano	Nome	
MVs/SantaCatarina.BRA/50.03	Croácia	2003	MVs.Zagreb.HRV.48.03	NI

Tabela 5-12: Mutações identificadas nas amostras brasileiras do genótipo D4 (proteína H) dos anos de 2006 em relação a amostras da Europa e Ásia.

Amostras	Sequências similares			Mutações
	País	Ano	Nome	
MVs/Bahia.BRA/46.06/2	India	2007	MVs/Papumpare.Ind/51.07/2	Q212R/E235G/R348G/L378M
	France	2005	Mvs/Mamoudzou.MAY/30.05/2	Q212R/Y350H/L378M/N447S
	India	2006	MVs/Kangra.Ind/39.06/1	Q212R/ L249P/K315R/L378M/
		2008	Mvs/GANGTOK.IND/27.08/2	A165T/Q212R /L378M/G613E

As sequências MVs/Geneva.CHE/16.10 e MVs/Berne.CHE743.08 foram comparadas entre si quanto aos resíduos de aminoácidos, revelando-se serem idênticas. Ao ser feito o BLAST, ficaram muito próximas às sequências brasileiras, e ao serem comparadas entre elas, foram identificadas algumas mutações descritas na Tabela 5-13.

Tabela 5-13 Mutações identificadas nas amostras brasileiras do genótipo D4 (proteína H) dos anos de 2010, 2011 e 2012 em relação a amostras da Europa.

Amostras	Sequências Similares			Mutações
	País	Ano	Nome	
MVs/SãoPaulo.BRA/42.11				NI
MVs/RioGrandedoSul.BRA/23.11				NI
MVs/RioGrandedoSul.BRA/16.11				G241S
MVs/RioGrandedoSul.BRA/14.11				G241S
MVs/RioGrandedoSul.BRA/13.11			MVs/Geneva.CHE/16.10/	G241S
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11	Switzerland	2010		R460K
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11/1		2008	MVs/Berne.CHE/43.08/	R460K
MVs/RiodeJaneiro.BRA/17.11				K395E
MVs/Pernambuco.BRA/2.12				NI
MVs/Para.BRA/30.10/2				NI
MVs/MinasGerais.BRA/41.11D4				R460K
MVs/MatoGrossoSul.BRA/10.11D4				G241S
NI – Não identificada				

Foi feita uma comparação entre as sequências brasileiras do gene H completo analisadas neste trabalho com a sequência referência para o genótipo D4 (Tabela 5-14) e identificamos várias substituições.

As substituições R212Q e G546S foram observadas em todas as sequências do gene H analisadas neste trabalho, quando comparadas com a sequência referência Montreal D4. Por outro lado as substituições L351P, G591S e H593R somente foram identificadas na sequência do ano de 2003 (MVs/SantaCatarina.BRA/50.03). Foi possível observar que a sequência MVs/Bahia.BRA/46.06/2 foi a que menos apresentou substituições ao ser comparada com a sequência referência.

Tabela 5-14: Substituições nos resíduos de aminoácidos (proteína H) nas sequências analisadas do vírus do sarampo do genótipo D4 circulante durante os anos de 2003, 2006, 2010, 2011 e 2012, em relação a sequência referência para o genótipo D4 (MVi/Montreal.CAN/89)

Amostras	Resíduos de aminoácidos															
	212	240	241	249	303	316	351	359	378	395	412	460	481	546	591	593
Montreal-Reference D4	R	S	S	L	E	G	L	A	M	E	V	K	N	G	G	H
MVs/SãoPaulo.BRA/42.11	Q	N		P	G	A		D			I		D	S		
MVs/SantaCatarina.BRA.BRA/50.03	Q			P			P							S	S	R
MVs/RioGrandedoSul.BRA/23.11	Q	N		P	G	A		D			I		D	S		
MVs/RioGrandedoSul.BRA/16.11	Q	N	G	P	G	A		D			I		D	S		
MVs/RioGrandedoSul.BRA/14.11	Q	N	G	P	G	A		D			I		D	S		
MVs/RioGrandedoSul.BRA/13.11	Q	N	G	P	G	A		D			I		D	S		
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11	Q	N		P	G	A		D			I	R	D	S		
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11/1	Q	N		P	G	A		D			I	R	D	S		
MVs/RiodeJaneiro.BRA/17.11	Q	N		P	G	A		D		K	I		D	S		
MVs/Pernambuco.BRA/2.12	Q	N		P	G	A		D			I		D	S		
MVs/Para.BRA/30.10/2	Q	N		P	G	A		D			I		D	S		
MVs/MinasGerais.BRA/41.11	Q	N		P	G	A		D			I	R	D	S		
MVs/MatoGrossodoSul.BRA/10.11	Q	N	G	P	G	A		D			I		D	S		
MVs/Bahia.BRA/46.06/2	Q								L					S		

Sequências compostas por aproximadamente 617 aminoácidos pertencentes ao gene H do vírus do sarampo genótipo D4. A numeração usada foi determinada a partir do primeiro aminoácido do gene H completo da sequência da cepa vacinal Schwarz. D=Ácido aspártico; S=Serina; E=Ácido glutâmico; T=Treonina; G=Glicina; V=Valina; K=Lisina; P=Prolina; N=Asparagina; F= Fenilalanina; L=Leucina; H=Histidina; R=Arginina; A=Alanina; I=Isoleucina; Y=Tirosina; Q=Glutamina.

Foi realizada também uma comparação entre as sequências brasileiras do gene H completo analisadas neste trabalho com a cepa vacinal Schwarz (Figura 5-15), com o objetivo de identificar alterações, principalmente em locais já reconhecidos por terem funções biológicas e imunológicas importantes, e estas se encontram descritas de forma resumida na Tabela 5-16.

Tabela 5-15: Substituições nos resíduos de aminoácidos (proteína H) nas sequências analisadas do vírus do sarampo do genótipo D4 circulante durante os anos de 2003, 2006, 2010, 2011 e 2012, em relação a sequência vacinal Schwarz

Amostras	Resíduos de aminoácidos																										
	117	174	176	211	212	240	241	243	249	252	276	284	296	302	303	316	351	359	378	395	412	416	460	473	481	591	593
Schwarz Vaccine 1994	L	T	T	G	R	S	S	R	L	Y	L	L	L	G	E	G	L	A	M	E	V	D	K	I	Y	G	H
MVs/SãoPaulo.BRA/42.11	F	A	A	S	Q	N		G	P	H	F	F	F	R	G	A		D			I	N		V	D		
MVs/SantaCatarina.BRA.BRA/50.03	F	A	A	S	Q			G	P	H	F	F	F	R			P					N		V	N	S	R
MVs/RioGrandedoSul.BRA/23.11	F	A	A	S	Q	N		G	P	H	F	F	F	R	G	A		D			I	N		V	D		
MVs/RioGrandedoSul.BRA/16.11	F	A	A	S	Q	N	G	G	P	H	F	F	F	R	G	A		D			I	N		V	D		
MVs/RioGrandedoSul.BRA/14.11	F	A	A	S	Q	N	G	G	P	H	F	F	F	R	G	A		D			I	N		V	D		
MVs/RioGrandedoSul.BRA/13.11	F	A	A	S	Q	N	G	G	P	H	F	F	F	R	G	A		D			I	N		V	D		
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11	F	A	A	S	Q	N		G	P	H	F	F	F	R	G	A		D			I	N	R	V	D		
MVs/RiodeJaneiro.BRA/19.11/1	F	A	A	S	Q	N		G	P	H	F	F	F	R	G	A		D			I	N	R	V	D		
MVs/RiodeJaneiro.BRA/17.11	F	A	A	S	Q	N		G	P	H	F	F	F	R	G	A		D		K	I	N		V	D		
MVs/Pernambuco.BRA/2.12	F	A	A	S	Q	N		G	P	H	F	F	F	R	G	A		D			I	N		V	D		
MVs/Para.BRA/30.10/2	F	A	A	S	Q	N		G	P	H	F	F	F	R	G	A		D			I	N		V	D		
MVs/MinasGerais.BRA/41.11	F	A	A	S	Q	N		G	P	H	F	F	F	R	G	A		D			I	N	R	V	D		
MVs/MatoGrossoSul.BRA/10.11	F	A	A	S	Q	N	G	G	P	H	F	F	F	R	G	A		D			I	N		V	D		
MVs/Bahia.BRA/46.06/2	F	A	A	S	Q			G		H	F	F	F	R					L			N		V	N		

Sequências compostas por aproximadamente 617 aminoácidos pertencentes ao gene H do vírus do sarampo genótipo D4. A numeração usada foi determinada a partir do primeiro aminoácido do gene H completo da sequência da cepa vacinal Schwarz. D=Ácido aspártico; S=Serina; E=Ácido glutâmico; T=Treonina; G=Glicina; V=Valina; K=Lisina; P=Prolina; N=Asparagina; F=Fenilalanina; L=Leucina; H=Histidina; R=Arginina; A=Alanina; I=Isoleucina; Y=Tirosina.

Na Tabela 5-15 é possível observar que a sequências MVs/Santacatarina.BRA/50.03 e MVs/Bahia.BRA/46.06/2 quando comparadas às sequências dos anos de 2010, 2011 e 2012, foram as que apresentaram menor número de substituições em resíduos de aminoácidos em relação à cepa vacinal Schwarz. Foi possível observar que a região da extremidade citoplasmática (1-34 aa) da proteína H que interage com a proteína M (Moll *et al.*, 2001) encontrava se completamente conservada. A substituição D416N, que constitui um sítio de glicosilação (Santibanez *et al.*, 2005) foi identificada em todas as sequências brasileiras do gene H. As substituições observadas nas sequências brasileiras não parecem ser importantes para as propriedades biológicas e imunológicas do vírus.

Tabela 5-16:Substituições em resíduos de aminoácidos (na proteína H completa) a partir da análise das sequências do vírus do sarampo genótipo D4 detectado no período de 2003 à 2012, quando comparadas com a cepa vacinal Schwarz, dando evidência as regiões com importância para as funções biológicas e imunológicas

Posição dos aminoácidos	Função da região de importância	Referência	Sequências Brasileiras
181 -199 309 - 318	Epítopos das células B	(Makela <i>et al.</i> , 1989); (Partidos <i>et al.</i> , 1991)	G316A foi observado em todas as sequências brasileiras, excepto na MVs/SantaCatarina.Bra/50.03 e MVs/Bahia.BRA/46.06/2
169 -171 188 - 190 200 -202 215 - 218 238 - 240	Sítios de glicosilação	(Alkhatib & Briedis, 1986); (Rota <i>et al.</i> , 1992)	S240N excpto na MVs/SantaCatarina.Bra/50.03 e MVs/Bahia.BRA/46.06/2
13 cisteínas 381 -394	Epitopos de anticorpos monoclonais e de oligomerização	(Alkhatib & Briedis, 1986); (Hu & Norrby, 1994)	NI
416	Afecta a hemaglutinação Sítio de glicosilação	(Saito <i>et al.</i> , 1995)	D416N foi observado em todas as sequências brasileiras
98 e 244 - 250	Coperação funcional entre a proteina H e F	(Fournier <i>et al.</i> , 1997); (Hummel & Bellini, 1995)	L249P foi observado em todas as sequências brasileiras, excpto na MVs/Bahia.BRA/46.06/2
F 431 V451 Y481 P486 I487	Interação com o receptor CD46	(Masse <i>et al.</i> , 2002); (Santiago <i>et al.</i> , 2002); (Vongpunsawad <i>et al.</i> , 2004)	Y481D foi observado em todas as sequências brasileiras, except na MVs/SantaCatarina.Bra/50.03 e MVs/Bahia.BRA/46.06/2 onde foi observado Y481N
V451 Y481	Habilidade para hemadsorção e fusão celular	(Sato <i>et al.</i> , 2012)	
I194 D505 Y529 D507 D530 T531 R533 H536 Y553 P554	Interação com o receptor celular SLAM	(Navaratnarajah <i>et al.</i> , 2008)	NI

NI – Não identificada

6. DISCUSSÃO

Desde a introdução da vacinação contra o sarampo, foi possível observar progressos significativos no controle desta doença, como a sua eliminação nas Américas e a dramática redução na mortalidade em todo o mundo. No entanto, o sarampo continua a ser endêmico em muitos países em desenvolvimento e em alguns países industrializados principalmente em crianças (Moss & Griffin, 2006; Nandy *et al.*, 2006; Wolfson *et al.*, 2009; WHO, 2012).

A detecção de casos importados em países em que a interrupção da transmissão foi alcançada, como o Brasil e demais países das Américas, embora não rara, aponta para a necessidade de manutenção da vigilância epidemiológica para novas e eventuais ocorrências de casos (Secretária de Vigilância em Saúde, 2010; Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011).

Um dos componentes essenciais da vigilância baseada no laboratório é a caracterização genética do vírus do sarampo, por permitir analisar e traçar a cadeia de transmissão do vírus (Rota *et al.*, 2009). Portanto, estudos que abordem a caracterização molecular de cada caso de sarampo identificado, pesquisando sua origem e sua evolução genética ao longo do tempo são fundamentais para os planos de eliminação do sarampo estabelecidos pela OMS.

O genótipo D4 encontra-se amplamente distribuído, causando múltiplos surtos e casos esporádicos em todo mundo. Na Europa, onde este genótipo tem sido largamente detectado, tem sido descritas a circulação de várias variantes do mesmo genótipo (WHO, 2011). No Brasil, o genótipo D4 do vírus do sarampo tem sido associado a vários surtos e casos esporádicos relacionados com importações do vírus, principalmente da Europa (Secretária de Vigilância em Saúde, 2010).

No presente trabalho analisamos molecularmente diferentes amostras biológicas para o vírus do sarampo, caracterizado como genótipo D4, obtidas de casos detectados nos anos de 2003, 2006, 2010, 2011 e 2012. Com o objetivo de buscar um melhor entendimento sobre a circulação e cadeia de transmissão das amostras deste vírus, analisamos todas as sequências da região variável C-terminal do gene N, já disponíveis no GenBank e no banco de dados do LVRs. Esta é a região do genoma do vírus do sarampo recomendada pela OMS para a identificação e monitoramento dos genótipos circulantes no mundo (WHO, 2012). Através

de análises filogenéticas das nossas amostras, foi possível identificar a relação das amostras brasileiras com o genótipo D4 do vírus do sarampo que tem circulado na Europa, revelando assim as diferentes fontes de importação desses vírus para o Brasil.

Estudos têm apontado para uma redução na variabilidade genética da região hipervariável da nucleoproteína do vírus do sarampo, o que pode dificultar a determinação da origem de um vírus usando apenas essa região do genoma, principalmente em regiões onde um genótipo específico tem sido detectado por um longo período de tempo, exemplo do genótipo D4 (WHO, 2012). Sendo assim, padronizamos o ensaio de sequenciamento do gene H completo, possibilitando análises filogenéticas mais detalhadas. O sequenciamento do gene H completo recomendado pela OMS sempre que se suspeitar de um novo genótipo, sendo uma ferramenta bastante útil na investigação de variações entre os subgrupos de um mesmo genótipo. Isto permite diferenciar os surtos que ocorrem em áreas geograficamente próximas e uma melhor determinação das cadeias de transmissão. Como a proteína H é alvo de anticorpos neutralizantes, o sequenciamento do seu gene pode ajudar a identificação de cepas virais com propriedades antigênicas alteradas. Além disso, nossos dados irão consolidar mais informações sobre esse gene ainda tão pouco estudado e de máxima importância para as atividades de vigilância do sarampo.

6.1. Isolamento do vírus do sarampo em culturas celulares Vero/SLAM

O Isolamento do vírus do sarampo é feito em cultura de células Vero / SLAM (WHO, 2007). Estas células são transfectadas com um plasmídeo que codifica SLAM (molécula de sinalização da ativação do linfócito, também conhecido como CD150), uma glicoproteína de membrana recentemente descoberta expressa em algumas células T e B, que é um receptor celular para o vírus do sarampo (Tatsuo *et al.*, 2000). Esta forma de detecção é feita a partir de amostras clínicas, como urina e secreção nasofaríngea. Em alguns casos a detecção viral por isolamento em cultura celular pode ser indicada para diagnóstico, mas é principalmente utilizada para fins de caracterização molecular (WHO, 2007). Por esse fato, um dos objetivos do nosso trabalho foi o isolamento do vírus do sarampo genótipo D4, em cultura de células Vero/hSLAM.

No presente estudo não foi possível obter isolados do vírus do sarampo após inoculação em células Vero/SLAM. Uma das causas pode ser explicada pela possível perda da

infectividade do vírus durante o transporte dos espécimes clínicos ao laboratório. Nossa revisão da literatura não identificou trabalhos cujos resultados estivessem totalmente de acordo com os nossos resultados. Naseri *et al.*, (2011) realizaram estudo que tinha como objetivo analisar molecularmente os genótipos que circularam antes e depois da campanha de vacinação em massa em 2003 no Irã. Foi descrito que dos 29 casos de sarampo do genótipo D4, apenas quatro destes foram isolados a partir de cultura de células, não tendo sido relatado qual das linhagens celulares (Vero/SLAM ou B95a) foi usado (Naseri *et al.*, 2011). Outro estudo, realizado na Índia, com objetivo de caracterizar o vírus do sarampo selvagem que circulou no período de 2005 á 2006 naquele país relata que, dos 54 casos estudados, foram obtidos 28 isolados em cultura de células Vero/SLAM ou B95a (Duraisamy *et al.*, 2012). Estes resultados podem refletir o fato de que o isolamento em cultura de células ser uma técnica de difícil execução, cujo sucesso depende principalmente do da forma como as amostras clínicas são acondicionadas e transportadas para o laboratório, assim como do período em que foram coletadas em relação ao início do exantema. Várias das nossas amostras foram coletadas após sete dias do início do exantema, o que pode ter prejudicado o isolamento viral em culturas celulares (WHO, 2007).

Além disso, um outro fator importante que contribuiu para a não detecção do vírus em cultura de células foi que as amostras clínicas permaneceram anos conservadas a -70°C. É sabido que o sucesso do isolamento viral dos paramyxovirus em culturas celulares é proporcional ao tempo entre a coleta do material clínico e a inoculação em cultura celulares. (WHO, 2007)

A confirmação do resultado do isolamento em cultura de células pode ser realizada pelas técnicas de imunofluorescência ou RT-PCR (WHO, 2007). Neste trabalho foi utilizada a técnica de RT-PCR para amplificação da região variável C-terminal do gene N (552pb), que é um ensaio que se encontra devidamente padronizado e estabelecido no LVRS (LVRS, 2010g). Os resultados deste ensaio confirmaram os resultados negativo obtidos no isolamento em cultura de células.

6.2. Caracterização molecular da região C-terminal da proteína N

A caracterização genética do vírus do sarampo como ferramenta molecular para vigilância é realizada através do sequenciamento dos genes que codificam as proteínas da

nucleoproteína (N) e/ ou hemaglutinina (H), os quais contêm a maior variabilidade genética (WHO, 2003; Rota *et al.*, 2009). O gene N tem a sua maior variabilidade nos 450 nucleotídeos que codificam para os 150 aminoácidos da região carboxi-terminal. Esta diversidade pode exceder até 12%, entre os vírus de diferentes genótipos (WHO, 2003). Portanto, um percentual de diversidade em um genótipo e entre os genótipos do mesmo grupo de até 2,5%, proposta em 2001 pela OMS, já não é mais aplicável (WHO, 2012).

Quando comparadas com a sequência (gene N parcial) referência para o genótipo D4, MVi/Montreal.CAN/89, as sequências do ano de 2003 coletadas no estado de Santa Catarina apresentaram um percentual de divergência de nucleotídeos de 2,2%. Estas sequências foram idênticas (100%) à sequência MVs/Zagreb.CRO/48.03 detectada na Croácia, que apresentou o mesmo percentual de divergência de nucleotídeos em relação à sequência referência do genótipo D4 (2,2%) como descrito por Forcic e colaboradores em 2005. Deste modo deixando claro que as amostras de 2003 foram resultado de uma importação e introdução única no Brasil. A sequência MVs/Zagreb.CRO/48.03 mostrou-se relacionada ao vírus isolado na Índia (subgrupo India-like) (Forcic *et al.*, 2005). Estes dados demonstram a rápida dispersão de variantes do mesmo genótipo, que está relacionada à alta infecciosidade do vírus do sarampo.

Em 2011, Naseri *et al.* descreveram que as sequências da região C-terminal do gene N do genótipo D4 detectado no Irã, quando comparadas entre si, apresentaram um percentual de divergência de nucleotídeos de no máximo 0,5%. No nosso estudo observamos que a divergência de nucleotídeos entre as amostras do ano de 2010, 2011 e 2012 foi de no máximo 0,2%. Esta baixa taxa sugere uma diversidade genética limitada entre os vírus do sarampo circulantes. Resultados semelhantes foram descritos Kessler *et al.*, (2011) em um estudo no qual foram analisadas sequências do genótipo D6 de amostras coletadas na Europa e na África, que eram idênticas entre si (Kessler *et al.*, 2011). Em outro estudo no qual foram analisadas as sequências dos genes N na Coreia durante a epidemia de 2000, foi descrita uma divergência de nucleotídeos de 0,7% (Na *et al.*, 2001). Assim, torna-se cada vez mais difícil determinar a origem de um vírus usando apenas essa parte do genoma, principalmente, como relatado acima, em regiões onde um genótipo em específico tem sido detectado por um longo período de tempo, exemplo do genótipo D4 (WHO, 2012).

Os resultados das nossas análises sugerem que o genótipo D4 do vírus do sarampo detectado no Brasil nos anos de 2010, 2011 e 2012 está relacionado a importações a partir da Europa, particularmente de variantes de sequência “Enfield” que têm circulado neste continente durante mais de quatro anos consecutivos (WHO, 2011; WHO, 2012).

Enviamos nossas sequências ao Laboratório Internacional para Sarampo e Rubéola da OMS em Londres para que fossem analisadas. De acordo com Brown e Myers (por email), o fato de algumas das sequências do genótipo D4 observadas no Brasil no ano de 2011, MVs/SaoPaulo.BRA/37.11/2, MVs/MinaGerais.BRA/41.11, MVs/SaoPaulo.BRA/51.11 agruparem-se em um mesmo ramo, e distanciando-se das demais do mesmo ano, sinalizam que essas sequências podem ser resultado de importações de variantes “Enfield” a partir da Europa. Entretanto existem evidências de que sequências idênticas às citadas acima têm sido detectadas em outras regiões do continente Americano (Brown & Myers 2012). A dificuldade em se definir as cadeias de transmissão dos vírus pode ser esclarecida com o aumento da região sequenciada, por exemplo, com a análise do gene H completo.

Ao analisarmos as sequências de aminoácidos da região C-terminal do gene N das sequências do genótipo D4 brasileiras, foi possível identificar várias substituições, que refletem a alta variabilidade desta região já descrita em trabalhos anteriores (Rota *et al.*, 1994; WHO, 2003). Por outro lado, muitas substituições em resíduos de aminoácidos identificadas nas sequências do gene N, mantiveram-se conservadas entre as amostras de 2010, 2011 e 2012. Este dado foi observado tanto quando as sequências foram comparadas com a cepa vacinal Schwarz, como quando foram confortadas com a sequência referência para o genótipo D4. Foram observadas alterações na região do gene N entre os aminoácidos 457-476 que foi descrita por Buckland *et al.*, (1989) como representando um dos três sítios antigênicos (Buckland *et al.*, 1989). O resíduo de aminoácido N522 está relacionado com a interação com hsp72 (proteína do choque térmico - “70-KDa heat shock proteína”) (Zhang *et al.*, 2005), que promove a síntese de RNA e a propagação do vírus do sarampo (Carsillo *et al.*, 2006). Entretanto, ainda não estão claras as implicações que as alterações observadas nesta região podem representar para as funções biológicas da proteína.

6.3. Caracterização molecular da proteína H completa

De acordo com o resultado das nossas análises, a divergência de nucleotídeos entre as sequências brasileiras do gene H completo do vírus do sarampo, genótipo D4, variou de 0,2% - 1,5%. Quando comparadas com a referência do genótipo D4 (MVi/Montreal.CAN/89), estas amostras apresentaram uma diversidade de 1,2%-1,9%. Esses resultados estão de acordo com o proposto pela OMS em 2001, de até 2,0% de diversidade dentro de um genótipo e entre os genótipos do mesmo grupo (WHO, 2012). Um percentual de divergência de nucleotídeos menor do que 2% dentro do mesmo genótipo, foi também descrito em outros estudos (Na *et al.*, 2001).

Similar ao observado pela análise do gene N, foi observado que a sequência MVs/SantaCatarina.BRA/50.03, do gene H completo quando comparada com a referência para o genótipo D4, apresentou um percentual de divergência de nucleotídeos de 1,3%. Essa sequência brasileira foi idêntica (100%) a sequência MVs/Zagreb.CRO/48.03 detectada na Croácia, a qual por sua vez apresentou o mesmo percentual de divergência de nucleotídeos em relação a sequência referência do genótipo D4 (1,3%) como descrito por Forcic *et al.* (2005) (Forcic *et al.*, 2005).

A detecção de variações genéticas no vírus do sarampo do tipo selvagem tem sugerido que estes vírus possam ter características antigênicas que lhes permitem circular de forma eficiente, mesmo na presença da imunidade induzida pela vacina (Rota, Featherstone *et al.* 2009). Entretanto, tenha sido descrito que o soro de pessoas vacinadas seja capaz de neutralizar todos os genótipos virais (com variações na eficiência) (Riddell *et al.*, 2005; Finsterbusch *et al.*, 2009; CDC, 2012) identificados até ao momento. De forma a garantir o sucesso dos programas de vacinação no controle do sarampo, torna-se importante o desenvolvimento de estudos posteriores que identifiquem mais variações genéticas e explorem o potencial dessas variações em gerar diferenças biológicas e imunológicas significativas entre as diferentes linhagens e genótipos.

Conhecimentos sobre o gene H são de grande importância pelo fato de que a proteína que o mesmo codifica (a glicoproteína de superfície responsável pela ligação inicial do vírus com a superfície das células) ser o principal alvo dos anticorpos neutralizantes. Resíduos de aminoácidos da proteína H, que têm estado sujeitos à adaptação evolutiva, foram

identificados (por meio de análise do sequenciamento do gene H) em posições associadas a epítomos de reconhecimento pela célula B (Makela *et al.*, 1989) e em sítios de interação com o receptor (Navaratnarajah *et al.*, 2008) e da atividade de hemaglutinação (Saito *et al.*, 1995). Estes dados sugerem que o vírus pode estar sobre pressão do sistema imune. A vigilância desta diversidade e de seu potencial impacto sobre o controle do sarampo deve ser constante, uma vez que a proteína H é o principal alvo da resposta imune induzida pela vacinação (Rota *et al.*, 2009).

A sequência completa de aminoácidos do gene H da amostra do ano de 2003 foi comparada com a sequência vacinal Schwarz, o que permitiu identificar as substituições T174A, T176A, R212Q, L296F, G302R, L351P, D416N, I473V, G591S e H593R. Essas substituições por nós identificadas estão em concordância com aquelas demonstradas por Forcic e colaboradores, em um estudo realizado na Croácia com objetivo de caracterizar geneticamente o vírus do sarampo do tipo selvagem isolado no período de 2003-2004 (Forcic *et al.*, 2005). A acumulação de mutações no do genoma viral e a modificação das características biológicas das proteínas codificadas, podem ocorrer rapidamente no vírus RNA, devido a falta de atividade de correção da RNA polimerase. Este acúmulo de mutações pode resultar em significantes “*drifts*” genéticos.

Após o sequenciamento do genoma completo do vírus do sarampo genótipo C2 detectado em um caso de SSPE na França, foram descritas 2 substituições na região dos primeiros 34 aminoácidos da extremidade citoplasmática da proteína H (Moulin *et al.* 2011). Essa região interage com a proteína M e contém o sinal de ordem para a localização intracelular (Moll *et al.*, 2001). Nossos resultados mostraram que esta região manteve-se conservada entre as sequências brasileiras.

O primeiro receptor celular para o vírus do sarampo a ser identificado foi CD46. Somente a vacina e as linhagens do vírus do sarampo adaptadas em laboratório poderiam utilizar o CD46 como receptor (Buckland & Wild 1997). Na sequência da proteína H das cepas vacinais encontramos uma tirosina no aa481 o que facilita a ligação com o receptor CD46 (Sato *et al.*, 2012). Nas sequências MVs/SantaCatarina.BRA/50.03 e MVs/Bahia.BRA/46.06/2 analisadas neste trabalho identificamos uma Asparagina (N) no resíduo de aminoácido 481. Indicando que estas provavelmente não usaram o receptor

CD46 para interagirem com a célula humanas. Por outro lado, as demais sequências dos anos 2010, 2011 e 2012 identificamos o ácido aspártico (D) nesse resíduo de aminoácido.

Em todas as sequências da hemaglutinina dos vírus do sarampo obtidas neste trabalho não foram encontradas alterações nos resíduos de aminoácidos I194, D505, D507, Y529, D530, T531, R533, H536, Y553, e P554 descritos como importantes para a interação da hemaglutinina do vírus com o receptor celular CD150 (Masse *et al.*, 2004; Vongpunsawad *et al.*, 2004; Navaratnarajah *et al.*, 2008). Estes resultados sugerem que os vírus aqui analisados podem ter utilizado o receptor CD150 para se ligarem a células.

Em um estudo realizado na Argentina, onde foram amplificados fragmentos de 377pb da hemaglutinina (8152 – 8417 nt) dos vírus do sarampo isolados durante o surto de 1997-1998, Barrero e colaboradores caracterizaram duas substituições em amostras do genótipo D6 (Barrero *et al.*, 2001). No presente estudo, não encontramos nenhuma coincidência com relação a estas substituições. O estudo de Na e colaboradores, observou várias substituições nas proteínas H e N dos vírus do sarampo selvagens ao serem comparados com as cepas vacinais. Os autores levantaram a possibilidade de que a imunidade induzida pela vacina pode não ser mais totalmente protetora contra o vírus do tipo selvagem (Na *et al.*, 2001). Esses resultados demonstram a importância da caracterização genética e antigênica do vírus do sarampo circulantes.

O sequenciamento da região codificante completa do gene H é recomendado sempre que se suspeitar de um novo genótipo. Além disso, esta análise pode ser utilizada para discriminar cepas vacinais de cepas selvagens. A análise da sequência do gene H permite discriminar genótipos que contêm sequências de nucleotídeos idênticas ou quase idênticas para o gene N (WHO, 2001; Rota *et al.*, 2009). O gene H ainda é pouco estudado, com poucas sequências disponíveis no GenBank e poucos trabalhos publicados, o que limita estudos em epidemiologia molecular que utilizam este marcador para a determinação da origem desses vírus. Portanto o nosso trabalho irá contribuir para uma melhor análise e compreensão da epidemia molecular do vírus do sarampo.

7. CONCLUSÃO

- Na nossa amostragem, não foi possível obter isolados do vírus do sarampo a partir da inoculação de amostras biológicas obtidas de casos da doença em cultura de Células Vero/SLAM.
- Foi possível amplificar e analisar molecularmente o gene H completo, permitindo assim observar que esse segmento é capaz de determinar o genótipo D4 anteriormente identificado pela análise do gene N parcial. Este segmento genômico foi capaz de também de apontar as diferentes fontes de origens da transmissão dos vírus do sarampo pertencentes aos genótipos D4 no Brasil.
- Na análise de variabilidade do Gene N parcial e do gene H completo foi possível observar que os vírus do sarampo do genótipo D4 que têm sido detectados no Brasil (2003-2012) apresentaram altas taxas de similaridade entre si e que estes se encontram relacionados a importações a partir da Europa.
- Após a caracterização molecular foram identificadas várias mutações nas sequências de aminoácidos, tanto do gene N parcial como do gene H completo do genótipo D4 do vírus do sarampo. Tais substituições não necessariamente implicam em alteração das propriedades antigênicas e imunológicas do vírus.

8. PRESPECTIVAS

- Aplicar e padronizar as diferentes metodologias desenvolvidas neste trabalho no Laboratório de Virologia em Moçambique, de forma a subsidiar a vigilância epidemiológica do sarampo em Moçambique.
- Continuar o estudo de caracterização molecular do vírus do sarampo, em todos os casos de sarampo detectados no Brasil, de forma a melhor monitorar os programas de eliminação em curso.
- Até o momento, o soro de pessoas vacinadas com vacinas produzidas com vírus do genótipo A, foi capaz de neutralizar todos os genótipos virais (com variações na eficiência) (Riddell *et al.*, 2005; Finsterbusch *et al.*, 2009; CDC, 2012). Algumas mutações têm sido descritas no genoma do vírus do sarampo, em particular na proteína H que é o principal alvo da resposta imune e pouco se sabe em relação a essas mutações. Portanto como perspectivas futuras, buscaremos dar continuidade ao sequenciamento do gene H e/ou de todo o genoma do vírus analisado neste trabalho.

9. BIBIOGRAFIA

Agocs MM, Markowitz LE, Straub I, Domok I. The 1988-1989 measles epidemic in Hungary: assessment of vaccine failure. *Int J Epidemiol*. 1992 Oct;21(5):1007-13.

Alkhatib G, Briedis DJ. The predicted primary structure of the measles virus hemagglutinin. *Virology*. 1986 Apr 30;150(2):479-90.

Andres O, Obojes K, Kim KS, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses. *J Gen Virol*. 2003 May;84(Pt 5):1189-97.

Annunziato D, Kaplan MH, Hall WW, Ichinose H, Lin JH, Balsam D, et al. Atypical measles syndrome: pathologic and serologic findings. *Pediatrics*. 1982 Aug;70(2):203-9.

Anon. Absence of transmission of the D9 measles virus—region of the Americas, November 2002–March 2003 (52). Accessed 15 de junho de 2012. Disponível em: www.paho.com

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

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

Baczko K, Pardowitz I, Rima BK, ter Meulen V. Constant and variable regions of measles virus proteins encoded by the nucleocapsid and phosphoprotein genes derived from lytic and persistent viruses. *Virology*. 1992 Sep;190(1):469-74.

Baliraine FN, Bwogi J, Bukonya H, Seguya R, Kabaliisa T, Kisakye A, et al. Possible interruption of measles virus transmission, Uganda, 2006-2009. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jan;17(1):110-3.

Bankamp B, Horikami SM, Thompson PD, Huber M, Billeter M, Moyer SA. Domains of the measles virus N protein required for binding to P protein and self-assembly. *Virology*. 1996 Feb 1;216(1):272-7.

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

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

Bankamp B, Lopareva EN, Kremer JR, Tian Y, Clemens MS, Patel R, et al. Genetic variability and mRNA editing frequencies of the phosphoprotein genes of wild-type measles viruses. *Virus Res*. 2008 Aug;135(2):298-306.

- Bankamp B, Takeda M, Zhang Y, Xu W, Rota PA. Genetic characterization of measles vaccine strains. *J Infect Dis.* 2011 Jul;204 Suppl 1:S533-48.
- Barclay AJ, Foster A, Sommer A. Vitamin A supplements and mortality related to measles: a randomised clinical trial. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1987 Jan 31;294(6567):294-6.
- Barnard DL. Inhibitors of measles virus. *Antivir Chem Chemother.* 2004 May;15(3):111-9.
- Barrero PR, Zandomeni RO, Mistchenko AS. Measles virus circulation in Argentina: 1991-1999. *Arch Virol.* 2001;146(4):815-23.
- Barrett T, Rima BK. Molecular biology of morbillivirus diseases of marine mammals. In: Pfeiffer CJ, editor. *Molecular and cell biology of marine mammals.* Malabra, FL: Krieger Pub. Co.; 2002. p. 161-72.
- Bartz R, Firsching R, Rima B, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. Differential receptor usage by measles virus strains. *J Gen Virol.* 1998 May;79 (Pt 5):1015-25.
- Bell AF, Whitton JL, Fujinami RS. Antisense-mediated resistance to measles virus infection in HeLa cells. *J Infect Dis.* 1997 Jul;176(1):258-61.
- Bellini WJ, Englund G, Rozenblatt S, Arnheiter H, Richardson CD. Measles virus P gene codes for two proteins. *J Virol.* 1985 Mar;53(3):908-19.
- Bellini WJ, Helfand RF. The challenges and strategies for laboratory diagnosis of measles in an international setting. *J Infect Dis.* 2003 May 15;187 Suppl 1:S283-90.
- Bellini WJ, Rota JS, Lowe LE, Katz RS, Dyken PR, Zaki SR, et al. Subacute sclerosing panencephalitis: more cases of this fatal disease are prevented by measles immunization than was previously recognized. *J Infect Dis.* 2005 Nov 15;192(10):1686-93.
- Bellini WJ, Rota PA. Genetic diversity of wild-type measles viruses: implications for global measles elimination programs. *Emerg Infect Dis.* 1998 Jan-Mar;4(1):29-35.
- Bieback K, Lien E, Klagge IM, Avota E, Schneider-Schaulies J, Duprex WP, et al. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol.* 2002 Sep;76(17):8729-36.
- Black FL. Measles endemicity in insular populations: critical community size and its evolutionary implication. *J Theor Biol.* 1966 Jul;11(2):207-11.
- Black FL. Measles. *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control* New.York. Kaslow RA: Plenum Publishing Corporation Evans AS; 1997.
- Black FL. The role of herd immunity in control of measles. *Yale J Biol Med.* 1982 May-Aug;55(3-4):351-60.

Bolt G, Pedersen IR. The role of subtilisin-like proprotein convertases for cleavage of the measles virus fusion glycoprotein in different cell types. *Virology*. 1998 Dec 20;252(2):387-98.

Bonthius DJ, Karacay B. Meningitis and encephalitis in children. An update. *Neurol Clin*. 2002 Nov;20(4):1013-38, vi-vii.

Bouche FB, Ertl OT, Muller CP. Neutralizing B cell response in measles. *Viral Immunol*. 2002;15(3):451-71.

Bradstreet JJ, El Dahr J, Anthony A, Kartzinel JJ, Wakefield AJ. Detection of Measles Virus Genomic RNA in Cerebrospinal Fluid of Children with Regressive Autism: a Report of Three Cases. *Journal of American Physicians and Surgeons*. 2004;9(2):38-45.

Brasil. Manual de Vigilância para a erradicação do sarampo e controle da rubéola. Saúde. Md, editor. Brasília: Fundação Nacional de saúde - Centro Nacional de Epidemiologia; 2001a.

Brasil. Plano Nacional de Erradicação do Sarampo. 2001b Acessado 14 de Outubro de 2011. Disponível em: http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/sarampo/pdf/plano_sarampo.pdf.

Brasília: CGDT-CGPNI/DEVEP/SVS/MS; 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/SVS/sarampo>.

Brown K, Myers R. Molecular analysis of measles virus genotype D4. [comunicação por e-mail]. Em 19 de novembro 2012.

Browning MB, Woodliff JE, Konkol MC, Pati NT, Ghosh S, Truitt RL, et al. The T cell activation marker CD150 can be used to identify alloantigen-activated CD4(+)25+ regulatory T cells. *Cell Immunol*. 2004 Feb;227(2):129-39.

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

Buckland R, Giraudon P, Wild F. Expression of measles virus nucleoprotein in *Escherichia coli*: use of deletion mutants to locate the antigenic sites. *J Gen Virol*. 1989 Feb;70 (Pt 2):435-41.

Buckland R, Wild TF. Is CD46 the cellular receptor for measles virus? *Virus Res*. 1997 Apr;48(1):1-9.

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

Campbell C, Levin S, Humphreys P, Walop W, Brannan R. Subacute sclerosing panencephalitis: results of the Canadian Paediatric Surveillance Program and review of the literature. *BMC Pediatr*. 2005;5:47.

- Campbell H, Andrews N, Brown KE, Miller E. Review of the effect of measles vaccination on the epidemiology of SSPE. *Int J Epidemiol.* 2007 Dec;36(6):1334-48.
- Carmichael AG. *Plague, Pox and Pestilence* 1st ed. London: Weidenfeld and Nicolson; 1997.
- Carsillo T, Zhang X, Vasconcelos D, Niewiesk S, Oglesbee M. A single codon in the nucleocapsid protein C terminus contributes to in vitro and in vivo fitness of Edmonston measles virus. *J Virol.* 2006 Mar;80(6):2904-12.
- Castillo-Solorzano C, Ruiz-Matus C. Compendium of measles. articles. . In: Pan American Organization-PAHO, editor.; 2009; Washington, DC. 2009.
- Castillo-Solorzano CC, Matus CR, Flannery B, Marsigli C, Tambini G, Andrus JK. The Americas: paving the road toward global measles eradication. *J Infect Dis.* 2011 Jul;204 Suppl 1:S270-8.
- Cathomen T, Buchholz CJ, Spielhofer P, Cattaneo R. Preferential initiation at the second AUG of the measles virus F mRNA: a role for the long untranslated region. *Virology.* 1995 Dec 20;214(2):628-32.
- Cathomen T, Naim HY, Cattaneo R. Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence. *J Virol.* 1998 Feb;72(2):1224-34.
- CDC. Elimination of measles- South Korea, 2001-2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2007;56:304-7.
- CDC. Progress toward the 2012 measles elimination goal–Western Pacific Region, 1990–2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009;58:669-73.
- CDC. Recommended Adult Immunization Schedule _ United States. *Journal [serial on the Internet].* 2012 Date; 61(Nº 4).
- Cherry JD, Shields WD. Encephalitis and meningoencephalitis. In: Feigin RD, Cherry JD, editors. *Textbook of pediatric infectious diseases.* 4th ed. Philadelphia: Saunders Company; 1998. p. 457-68.
- Chibo D, Birch CJ, Rota PA, Catton MG. Molecular characterization of measles viruses isolated in Victoria, Australia, between 1973 and 1998. *J Gen Virol.* 2000 Oct;81(Pt 10):2511-8.
- Chowdhary J, Ashraf SM, Khajuria K. Measles with acute disseminated encephalomyelitis (ADEM). *Indian Pediatr.* 2009 Jan;46(1):72-4.
- Clements CJ, Milstein JB, Grabowsky M. Research into alternative measles vaccines in the 1990's. *Expanded Programme on Immunization, World Health Organization.* Gen/88. 1988;Rev. 1.

Cocks BG, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, de Vries JE, Aversa G. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature*. 1995 Jul 20;376(6537):260-3.

Condack C, Grivel JC, Devaux P, Margolis L, Cattaneo R. Measles virus vaccine attenuation: suboptimal infection of lymphatic tissue and tropism alteration. *J Infect Dis*. 2007 Aug 15;196(4):541-9.

Corry D, Kulkarni P, Lipscomb MF. The migration of bronchoalveolar macrophages into hilar lymph nodes. *Am J Pathol*. 1984 Jun;115(3):321-8.

Crowley JC, Dowling PC, Menonna J, Silverman JI, Schuback D, Cook SD, et al. Sequence variability and function of measles virus 3' and 5' ends and intercistronic regions. *Virology*. 1988 Jun;164(2):498-506.

Cutts FT, Henao-Restrepo A, Olive JM. Measles elimination: progress and challenges. *Vaccine*. 1999 Oct 29;17 Suppl 3:S47-52.

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

Dawson JR. Cellular inclusion in cerebral lesions of lethargic encephalitis. *Am J Pathol*. 1933;9:7-15.

de Quadros CA, Andrus JK, Danovaro-Holliday MC, Castillo-Solorzano C. Feasibility of global measles eradication after interruption of transmission in the Americas. *Expert Rev Vaccines*. 2008 Apr;7(3):355-62.

de Quadros CA, Izurieta H, Venczel L, Carrasco P. Measles eradication in the Americas: progress to date. *J Infect Dis*. 2004 May 1;189 Suppl 1:S227-35.

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

de Swart RL, Ludlow M, de Witte L, Yanagi Y, van Amerongen G, McQuaid S, et al. Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS Pathog*. 2007 Nov;3(11):e178.

de Swart RL, Yuksel S, Osterhaus AD. Relative contributions of measles virus hemagglutinin- and fusion protein-specific serum antibodies to virus neutralization. *J Virol*. 2005 Sep;79(17):11547-51.

de Swart RL. The pathogenesis of measles revisited. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Oct;27(10 Suppl):S84-8.

de Vries RD, Lemon K, Ludlow M, McQuaid S, Yuksel S, van Amerongen G, et al. In vivo tropism of attenuated and pathogenic measles virus expressing green fluorescent protein in macaques. *J Virol*. 2010 May;84(9):4714-24.

de Witte L, Abt M, Schneider-Schaulies S, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *J Virol*. 2006 Apr;80(7):3477-86.

de Witte L, de Vries RD, van der Vlist M, Yuksel S, Litjens M, de Swart RL, et al. DC-SIGN and CD150 have distinct roles in transmission of measles virus from dendritic cells to T-lymphocytes. *PLoS Pathog*. 2008 Apr;4(4):e1000049.

del Toro-Riera M, Macaya-Ruiz A, Raspall-Chaure M, Tallada-Serra M, Pasqual-Lopez I, Roig-Quilis M. [Subacute sclerosing panencephalitis: combined treatment with interferon alpha and intraventricular ribavirin]. *Rev Neurol*. 2006 Mar 1-15;42(5):277-81.

Devaux P, Cattaneo R. Measles virus phosphoprotein gene products: conformational flexibility of the P/V protein amino-terminal domain and C protein infectivity factor function. *J Virol*. 2004 Nov;78(21):11632-40.

Devaux P, Hodge G, McChesney MB, Cattaneo R. Attenuation of V- or C-defective measles viruses: infection control by the inflammatory and interferon responses of rhesus monkeys. *J Virol*. 2008 Jun;82(11):5359-67.

Djebbi A, Bahri O, Mokhtariazad T, Alkhatib M, Ben Yahia A, Rezig D, et al. Identification of measles virus genotypes from recent outbreaks in countries from the Eastern Mediterranean Region. *J Clin Virol*. 2005 Sep;34(1):1-6.

Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell*. 1993 Oct 22;75(2):295-305.

D'Souza RM, D'Souza R. Vitamin A for treating measles in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002(1):CD001479.

Duke T, Mgone CS. Measles: not just another viral exanthem. *Lancet*. 2003 Mar 1;361(9359):763-73.

Duraisamy R, Rota PA, Palani G, Elango V, Sambasivam M, Lowe L, et al. Molecular characterization of wild-type measles viruses in Tamil Nadu, India, during 2005-2006: relationship of genotype D8 strains from Tamil Nadu to global strains. *J Med Virol*. 2012 Feb;84(2):348-57.

Duvdevani P, Varsano N, Slepon R, Lerman Y, Shohat T, Mendelson E. Determination of immunity to measles virus in young adults: comparative evaluation of a commercial enzyme immunoassay and the hemagglutination inhibition techniques. *Clin Diagn Virol*. 1996 Oct;7(1):1-6.

El Mubarak HS, van de Bildt MW, Mustafa OA, Vos HW, Mukhtar MM, Ibrahim SA, et al. Genetic characterization of wild-type measles viruses circulating in suburban Khartoum, 1997-2000. *J Gen Virol*. 2002 Jun;83(Pt 6):1437-43.

Enders JF, Peebles TC, McCarthy K, Milovanovic M, Mitus A, Holloway A. Measles virus: a summary of experiments concerned with isolation, properties, and behavior. *Am J Public Health Nations Health*. 1957 Mar;47(3):275-82.

Endo A, Izumi H, Miyashita M, Taniguchi K, Okubo O, Harada K. Current efficacy of postexposure prophylaxis against measles with immunoglobulin. *J Pediatr.* 2001 Jun;138(6):926-8.

Erlenhoefler C, Wurzer WJ, Loffler S, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J Virol.* 2001 May;75(10):4499-505.

Ertl OT, Wenz DC, Bouche FB, Berbers GA, Muller CP. Immunodominant domains of the Measles virus hemagglutinin protein eliciting a neutralizing human B cell response. *Arch Virol.* 2003 Nov;148(11):2195-206.

Esolen LM, Park SW, Hardwick JM, Griffin DE. Apoptosis as a cause of death in measles virus-infected cells. *J Virol.* 1995 Jun;69(6):3955-8.

Esolen LM, Ward BJ, Moench TR, Griffin DE. Infection of monocytes during measles. *J Infect Dis.* 1993 Jul;168(1):47-52.

Felssenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985;39:783-91.

Fernandez H, Banks G, Smith R. Ribavirin: a clinical overview. *Eur J Epidemiol.* 1986 Mar;2(1):1-14.

Fernandez-Munoz R, Celma ML. Measles virus from a long-term persistently infected human T lymphoblastoid cell line, in contrast to the cytotoxic parental virus, establishes an immediate persistence in the original cell line. *J Gen Virol.* 1992 Sep;73 (Pt 9):2195-202.

Ferrari MJ, Grais RF, Bharti N, Conlan AJ, Bjornstad ON, Wolfson LJ, et al. The dynamics of measles in sub-Saharan Africa. *Nature.* 2008 Feb 7;451(7179):679-84.

Fine PE, Clarkson JA. Measles in England and Wales--I: An analysis of factors underlying seasonal patterns. *Int J Epidemiol.* 1982 Mar;11(1):5-14.

Finsterebusch T, Wolbert A, Deitemeier I, Meyer K, Mosquera MM, Mankertz A, et al. Measles viruses of genotype H1 evade recognition by vaccine-induced neutralizing antibodies targeting the linear haemagglutinin noose epitope. *J Gen Virol.* 2009 Nov;90(Pt 11):2739-45.

Forcic D, Ivancic J, Baricevic M, Mahovlic V, Tesovic G, Bozinovic D, et al. Genetic characterization of wild type measles virus isolated in Croatia during the 2003-2004 outbreak. *J Med Virol.* 2005 Feb;75(2):307-12.

Forni AL, Schluger NW, Roberts RB. Severe measles pneumonitis in adults: evaluation of clinical characteristics and therapy with intravenous ribavirin. *Clin Infect Dis.* 1994 Sep;19(3):454-62.

Fournier P, Brons NH, Berbers GA, Wiesmuller KH, Fleckenstein BT, Schneider F, et al. Antibodies to a new linear site at the topographical or functional interface between the

haemagglutinin and fusion proteins protect against measles encephalitis. *J Gen Virol.* 1997 Jun;78 (Pt 6):1295-302.

Freeman AF, Jacobsohn DA, Shulman ST, Bellini WJ, Jaggi P, de Leon G, et al. A new complication of stem cell transplantation: measles inclusion body encephalitis. *Pediatrics.* 2004 Nov;114(5):e657-60.

Fugier-Vivier I, Servet-Delprat C, Rivaller P, Rissoan MC, Liu YJ, Roubourdin-Combe C. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J Exp Med.* 1997 Sep 15;186(6):813-23.

Furuse Y, Suzuki A, Oshitani H. Origin of measles virus: divergence from rinderpest virus between the 11th and 12th centuries. *Virol J.* 2010;7:52.

Gagnon A, Bouchard RW. Fulminating adult-onset subacute sclerosing panencephalitis in a 49-year-old man. *Arch Neurol.* 2003 Aug;60(8):1160-1.

Gascon GG. Randomized treatment study of inosiplex versus combined inosiplex and intraventricular interferon-alpha in subacute sclerosing panencephalitis (SSPE): international multicenter study. *J Child Neurol.* 2003 Dec;18(12):819-27.

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

Gilbert C. Childhood blindness. In: Johnson G, Minnassian D, Weale R, editors. *Epidemiology of Eye Diseases.* London: Chapman and Hall; 1998. p. 168-8.

Giraudon P, Jacquier MF, Wild TF. Antigenic analysis of African measles virus field isolates: identification and localisation of one conserved and two variable epitope sites on the NP protein. *Virus Res.* 1988 May;10(2-3):137-52.

Goldberger J, Anderson JF. An experimental demonstration of the presence of the virus of measles in the mixed buccal and nasal secretions. *JAMA.* 1911;57:496-578.

Gombart AF, Hirano A, Wong TC. Conformational maturation of measles virus nucleocapsid protein. *J Virol.* 1993 Jul;67(7):4133-41

Gombart AF, Hirano A, Wong TC. Expression and properties of the V protein in acute measles virus and subacute sclerosing panencephalitis virus strains. *Virus Res.* 1992 Sep 1;25(1-2):63-78.

Gouandjika-Vasilache I, Waku-Kouomou D, Menard D, Beyrand C, Guye F, Ngoay-Kossy JC, et al. Cocirculation of measles virus genotype B2 and B3.1 in Central African Republic during the 2000 measles epidemic. *J Med Virol.* 2006 Jul;78(7):964-70.

Grais RF, Dubray C, Gerstl S, Guthmann JP, Djibo A, Nargaye KD, et al. Unacceptably high mortality related to measles epidemics in Niger, Nigeria, and Chad. *PLoS Med.* 2007 Jan;4(1):e16.

Griffin DE, Cooper SJ, Hirsch RL, Johnson RT, Lindo de Soriano I, Roedenbeck S, et al. Changes in plasma IgE levels during complicated and uncomplicated measles virus infections. *J Allergy Clin Immunol*. 1985 Aug;76(2 Pt 1):206-13.

Griffin DE, Lin WH, Pan CH. Measles virus, immune control, and persistence. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 May;36(3):649-62.

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

Griffin DE, Ward BJ. Differential CD4 T cell activation in measles. *J Infect Dis*. 1993 Aug;168(2):275-81.

Griffin DE. Measles virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. p. 1551-85.

Griffin DE. Measles virus-induced suppression of immune responses. *Immunol Rev*. 2010 Jul;236:176-89.

Gururangan S, Stevens RF, Morris DJ. Ribavirin response in measles pneumonia. *J Infect*. 1990 May;20(3):219-21.

Hall WJ, Hall CB. Atypical measles in adolescents: evaluation of clinical and pulmonary function. *Ann Intern Med*. 1979 Jun;90(6):882-6.

Hamaguchi M, Yoshida T, Nishikawa K, Naruse H, Nagai Y. Transcriptional complex of Newcastle disease virus. I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex. *Virology*. 1983 Jul 15;128(1):105-17.

Hanninen P, Arstila P, Lang H, Salmi A, Panelius M. Involvement of the central nervous system in acute, uncomplicated measles virus infection. *J Clin Microbiol*. 1980 Jun;11(6):610-3.

Hanses F, Truong AT, Ammerlaan W, Ikusika O, Adu F, Oyefolu AO, et al. Molecular epidemiology of Nigerian and Ghanaian measles virus isolates reveals a genotype circulating widely in western and central Africa. *J Gen Virol*. 1999 Apr;80 (Pt 4):871-7.

Hara S, Kimura H, Hoshino Y, Hayashi N, Negoro T, Okumura A, et al. Combination therapy with intraventricular interferon-alpha and ribavirin for subacute sclerosing panencephalitis and monitoring measles virus RNA by quantitative PCR assay. *Brain Dev*. 2003 Aug;25(5):367-9.

Hayden GF. Measles vaccine failure. A survey of causes and means of prevention. *Clin Pediatr (Phila)*. 1979 Mar;18(3):155-6, 61-3, 67.

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

Helfand RF, Witte D, Fowlkes A, Garcia P, Yang C, Fudzulani R, et al. Evaluation of the immune response to a 2-dose measles vaccination schedule administered at 6 and 9 months of age to HIV-infected and HIV-uninfected children in Malawi. *J Infect Dis.* 2008 Nov 15;198(10):1457-65.

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

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

Hirano A, Wang AH, Gombart AF, Wong TC. The matrix proteins of neurovirulent subacute sclerosing panencephalitis virus and its acute measles virus progenitor are functionally different. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Sep 15;89(18):8745-9.

Hirayama M. Measles vaccines used in Japan. *Rev Infect Dis.* 1983 May-Jun;5(3):495-503.

Hoffman SJ, Polack FP, Hauer DA, Singh M, Billeter MA, Adams RJ, et al. Vaccination of rhesus macaques with a recombinant measles virus expressing interleukin-12 alters humoral and cellular immune responses. *J Infect Dis.* 2003 Nov 15;188(10):1553-61.

Horikami SM, Curran J, Kolakofsky D, Moyer SA. Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. *J Virol.* 1992 Aug;66(8):4901-8.

Horikami SM, Smallwood S, Bankamp B, Moyer SA. An amino-proximal domain of the L protein binds to the P protein in the measles virus RNA polymerase complex. *Virology.* 1994 Dec;205(2):540-5.

Hosoya M. [Therapy and prognosis in subacute sclerosing panencephalitis]. *Nihon Rinsho.* 2007 Aug;65(8):1483-6.

Hosoya M. Measles encephalitis: direct viral invasion or autoimmune-mediated inflammation? *Intern Med.* 2006;45(14):841-2.

Hsu EC, Iorio C, Sarangi F, Khine AA, Richardson CD. CDw150(SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology.* 2001 Jan 5;279(1):9-21.

Hu A, Cattaneo R, Schwartz S, Norrby E. Role of N-linked oligosaccharide chains in the processing and antigenicity of measles virus haemagglutinin protein. *J Gen Virol.* 1994 May;75 (Pt 5):1043-52

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

Hu A, Sheshberadaran H, Norrby E, Kovamees J. Molecular characterization of epitopes on the measles virus hemagglutinin protein. *Virology.* 1993 Jan;192(1):351-4.

- Huang SP, Shieh GJ, Lee L, Teng HJ, Kao ST, Lin JG. Inhibition effect of shengma-gegen-tang on measles virus in Vero cells and human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Chin Med.* 1997;25(1):89-96.
- Hughes I, Jenney ME, Newton RW, Morris DJ, Klapper PE. Measles encephalitis during immunosuppressive treatment for acute lymphoblastic leukaemia. *Arch Dis Child.* 1993 Jun;68(6):775-8.
- Hummel KB, Bellini WJ. Localization of monoclonal antibody epitopes and functional domains in the hemagglutinin protein of measles virus. *J Virol.* 1995 Mar;69(3):1913-6.
- Hussey GD, Clements CJ. Clinical problems in measles case management. *Ann Trop Paediatr.* 1996 Dec;16(4):307-17.
- Hussey GD, Klein M. A randomized, controlled trial of vitamin A in children with severe measles. *N Engl J Med.* 1990 Jul 19;323(3):160-4.
- Hussey GD, Klein M. Routine high-dose vitamin A therapy for children hospitalized with measles. *J Trop Pediatr.* 1993 Dec;39(6):342-5.
- Hussey GD. Measles. In: Semba RD, Bloem MW, editors. *Nutrition and Health in Developing Countries.* Totowa: Humana Press; 2001. p. 163-76.
- Hyypia T, Korkiamaki P, Vainionpaa R. Replication of measles virus in human lymphocytes. *J Exp Med.* 1985 Jun 1;161(6):1261-71.
- Iwasaki M, Takeda M, Shirogane Y, Nakatsu Y, Nakamura T, Yanagi Y. The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein. *J Virol.* 2009 Oct;83(20):10374-83.
- Jin L, Richards A, Brown DW. Development of a dual target-PCR for detection and characterization of measles virus in clinical specimens. *Mol Cell Probes.* 1996 Jun;10(3):191-200.
- Johnson RT, Griffin DE, Hirsch RL, Wolinsky JS, Roedenbeck S, Lindo de Soriano I, et al. Measles encephalomyelitis--clinical and immunologic studies. *N Engl J Med.* 1984 Jan 19;310(3):137-41.
- Joseph BS, Lampert PW, Oldstone MB. Replication and persistence of measles virus in defined subpopulations of human leukocytes. *J Virol.* 1975 Dec;16(6):1638-49.
- Kabra SK, Lodha R, Hilton DJ. Antibiotics for preventing complications in children with measles. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008(3):CD001477.
- Kaneko M, Yamashita Y, Nagamitsu S, Nakayama T, Matsuishi T. Severe infantile measles encephalitis occurred three months after neonatal measles. *Neuropediatrics.* 2002 Oct;33(5):274-7.

- Kaplan LJ, Daum RS, Smaron M, McCarthy CA. Severe measles in immunocompromised patients. *JAMA*. 1992 Mar 4;267(9):1237-41.
- Karlin D, Longhi S, Canard B. Substitution of two residues in the measles virus nucleoprotein results in an impaired self-association. *Virology*. 2002 Oct 25;302(2):420-32.
- Kato A, Kiyotani K, Sakai Y, Yoshida T, Nagai Y. The paramyxovirus, Sendai virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis. *EMBO J*. 1997 Feb 3;16(3):578-87.
- Keeling MJ, Grenfell BT. Disease extinction and community size: modeling the persistence of measles. *Science*. 1997 Jan 3;275(5296):65-7.
- Keeling MJ. Modelling the persistence of measles. *Trends Microbiol*. 1997 Dec;5(12):513-8.
- Keniscope C, Juliana R, Subri H, Shangari SR, Wan Nor Azlina WA, Hamizah A, et al. Isolation of measles virus from clinical specimens using B95a and Vero/hSLAM cell-lines. *Med J Malaysia*. 2009 Mar;64(1):37-40.
- Kessler JR, Kremer JR, Shulga SV, Tikhonova NT, Santibanez S, Mankertz A, et al. Revealing new measles virus transmission routes by use of sequence analysis of phosphoprotein and hemagglutinin genes. *J Clin Microbiol*. 2011 Feb;49(2):677-83.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980 Dec;16(2):111-20.
- Kingsbury DW, Bratt MA, Choppin PW, Hanson RP, Hosaka Y, ter Muelen V, et al. *Paramyxoviridae Inervirology*. 1978;10:137-52.
- Kingston RL, Hamel DJ, Gay LS, Dahlquist FW, Matthews BW. Structural basis for the attachment of a paramyxoviral polymerase to its template. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 1;101(22):8301-6.
- Kiple KF. *The Cambridge World History of Human Disease*. Cambridge University Press; 1993.
- Klinge M, Hartter HK, Adu F, Ammerlaan W, Ikusika W, Muller CP. Resistance of recent measles virus wild-type isolates to antibody-mediated neutralization by vaccinees with antibody. *J Med Virol*. 2000 Sep;62(1):91-8.
- Kobune F, Sakata H, Sugiura A. Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. *J Virol*. 1990 Feb;64(2):700-5.
- Kobune F, Takahashi H, Terao K, Ohkawa T, Ami Y, Suzaki Y, et al. Nonhuman primate models of measles. *Lab Anim Sci*. 1996 Jun;46(3):315-20.

Koschel K, Brinckmann U, Hoyningen-Huene VV. Measles virus antisense sequences specifically cure cells persistently infected with measles virus. *Virology*. 1995 Feb 20;207(1):168-78.

Kouomou DW, Nerrienet E, Mfoupouendoun J, Tene G, Whittle H, Wild TF. Measles virus strains circulating in Central and West Africa: Geographical distribution of two B3 genotypes. *J Med Virol*. 2002 Nov;68(3):433-40.

Kouomou DW, Wild TF. Adaptation of wild-type measles virus to tissue culture. *J Virol*. 2002 Feb;76(3):1505-9.

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

Kreis S, Vardas E, Whistler T. Sequence analysis of the nucleocapsid gene of measles virus isolates from South Africa identifies a new genotype. *J Gen Virol*. 1997 Jul;78 (Pt 7):1581-7.

Kremer JR, Nkwembe E, Bola Oyefolu AO, Smit SB, Pukuta E, Omilabu SA, et al. Measles virus strain diversity, Nigeria and Democratic Republic of the Congo. *Emerg Infect Dis*. 2010 Nov;16(11):1724-30.

Kruse M, Meinel E, Henning G, Kuhnt C, Berchtold S, Berger T, et al. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. *J Immunol*. 2001 Aug 15;167(4):1989-95.

Lamb RA, Kolakofsky D. Paramyxoviridae: The viruses and Their Replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2001. p. 1305-40.

Lecciones JA, Abejar NH, Dimaano EE, Bartolome R, Cinco S, Mariano N, et al. A pilot double-blind, randomized, and placebo-controlled study of orally administered IFN-alpha-n1 (Ins) in pediatric patients with measles. *J Interferon Cytokine Res*. 1998 Sep;18(9):647-52.

Lehmann C, Wilkening A, Leiber D, Markus A, Krug N, Pabst R, et al. Lymphocytes in the bronchoalveolar space reenter the lung tissue by means of the alveolar epithelium, migrate to regional lymph nodes, and subsequently rejoin the systemic immune system. *Anat Rec*. 2001 Nov 1;264(3):229-36.

Liebert UG, Flanagan SG, Loffler S, Baczko K, ter Meulen V, Rima BK. Antigenic determinants of measles virus hemagglutinin associated with neurovirulence. *J Virol*. 1994 Mar;68(3):1486-93

Liston P, Batal R, DiFlumeri C, Briedis DJ. Protein interaction domains of the measles virus nucleocapsid protein (NP). *Arch Virol*. 1997;142(2):305-21.

Liston P, Briedis DJ. Measles virus V protein binds zinc. *Virology*. 1994 Jan;198(1):399-404.

Longhi S, Receveur-Brechot V, Karlin D, Johansson K, Darbon H, Bhella D, et al. The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein. *J Biol Chem.* 2003 May 16;278(20):18638-48.

Lucas J. An account of uncommon symptoms succeeding the measles; with additional remarks on the infection of measles and smallpox. *London Med* 1970;11:325-31.

Ludlow M, Rennick LJ, Sarlang S, Skibinski G, McQuaid S, Moore T, et al. Wild-type measles virus infection of primary epithelial cells occurs via the basolateral surface without syncytium formation or release of infectious virus. *J Gen Virol.* 2010 Apr;91(Pt 4):971-9.

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

LVRS. POP-LVRS-TC-001 - Eletroforese em gel de agarose E-power Base (Invitrogen). In: Motta F, editor. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2010a.

LVRS. POP-LVRS-TC-003 - Quantificação de DNA por eletroforese no gel de agarose. In: Motta F, editor. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2010c. p. 6.

LVRS. POP-LVRS-TC-004 - Purificação de produto de PCR extraído do gel de agarose com o kit "QIAquick Gel Extraction". In: Motta F, editor. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2010b. p. 9.

LVRS. POP-LVRS-TC-006 - Extração de RNA Kit "QIAmp viral RNA mini kit". In: Motta F, editor. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2010d. p. 10.

LVRS. POP-LVRS-TC-007 - Preparação das amostras para sequenciamento automático de nucleotídeos - Kit Big Dye Terminator Cycle sequencing standard "versão 3.1". In: Motta F, editor. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2010e. p. 11.

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

LVRS. POP-LVRS-TE-011 - Transcrição reversa aplicada ao vírus da rubéola e do sarampo utilizando a enzima MMLV. In: Lemos X, editor. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2010f.

LVRS. POP-LVRS-TE-018 - PCR- reação em cadeia da polimerase aplicada aos genes N e H do vírus do sarampo. In: Lemos X, editor. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2010g.

Madsen KM, Hviid A, Vestergaard M, Schendel D, Wohlfahrt J, Thorsen P, et al. A population-based study of measles, mumps, and rubella vaccination and autism. *N Engl J Med.* 2002 Nov 7;347(19):1477-82.

Maisner A, Mrkic B, Herrler G, Moll M, Billeter MA, Cattaneo R, et al. Recombinant measles virus requiring an exogenous protease for activation of infectivity. *J Gen Virol.* 2000 Feb;81(Pt 2):441-9.

Makela MJ, Lund GA, Salmi AA. Antigenicity of the measles virus haemagglutinin studied by using synthetic peptides. *J Gen Virol.* 1989 Mar;70 (Pt 3):603-14.

Makino S. Development and characteristics of live AIK-C measles virus vaccine: a brief report. *Rev Infect Dis.* 1983 May-Jun;5(3):504-5.

Manchester M, Smith KA, Eto DS, Perkin HB, Torbett BE. Targeting and hematopoietic suppression of human CD34+ cells by measles virus. *J Virol.* 2002 Jul;76(13):6636-42.

Marie JC, Saltel F, Escola JM, Jurdic P, Wild TF, Horvat B. Cell surface delivery of the measles virus nucleoprotein: a viral strategy to induce immunosuppression. *J Virol.* 2004 Nov;78(21):11952-61.

Masse N, Ainouze M, Neel B, Wild TF, Buckland R, Langedijk JP. Measles virus (MV) hemagglutinin: evidence that attachment sites for MV receptors SLAM and CD46 overlap on the globular head. *J Virol.* 2004 Sep;78(17):9051-63.

Masse N, Barrett T, Muller CP, Wild TF, Buckland R. Identification of a second major site for CD46 binding in the hemagglutinin protein from a laboratory strain of measles virus (MV): potential consequences for wild-type MV infection. *J Virol.* 2002 Dec;76(24):13034-8.

Mbugua FM, Okoth FA, Gray M, Kamau T, Kalu A, Eggers R, et al. Molecular epidemiology of measles virus in Kenya. *J Med Virol.* 2003 Dec;71(4):599-604.

McChesney MB, Miller CJ, Rota PA, Zhu YD, Antipa L, Lerche NW, et al. Experimental measles. I. Pathogenesis in the normal and the immunized host. *Virology.* 1997 Jun 23;233(1):74-84.

McNeil W. *Plagues and Peoples* New York. Anchor Press/Doubleday. 1976.

McQuaid S, Cosby SL. An immunohistochemical study of the distribution of the measles virus receptors, CD46 and SLAM, in normal human tissues and subacute sclerosing panencephalitis. *Lab Invest.* 2002 Apr;82(4):403-9.

Merz DC, Scheid A, Choppin PW. Importance of antibodies to the fusion glycoprotein of paramyxoviruses in the prevention of spread of infection. *J Exp Med.* 1980 Feb 1;151(2):275-88.

Minagawa H, Tanaka K, Ono N, Tatsuo H, Yanagi Y. Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J Gen Virol.* 2001 Dec;82(Pt 12):2913-7.

Miyazaki M, Nishimura M, Toda Y, Saijo T, Mori K, Kuroda Y. Long-term follow-up of a patient with subacute sclerosing panencephalitis successfully treated with intrathecal interferon alpha. *Brain Dev.* 2005 Jun;27(4):301-3.

Moench TR, Griffin DE, Obriecht CR, Vaisberg AJ, Johnson RT. Acute measles in patients with and without neurological involvement: distribution of measles virus antigen and RNA. *J Infect Dis.* 1988 Aug;158(2):433-42.

- Moll M, Klenk HD, Herrler G, Maisner A. A single amino acid change in the cytoplasmic domains of measles virus glycoproteins H and F alters targeting, endocytosis, and cell fusion in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem.* 2001 May 25;276(21):17887-94.
- Mosquera MM, De Ory F, Echevarria JE, Plan NwoLotSNME. Measles Virus genotyping and Circulating Genotypes. *The Open Vaccine Journal.* 2010;3:76-85.
- Moss WJ, Cutts F, Griffin DE. Implications of the human immunodeficiency virus epidemic for control and eradication of measles. *Clin Infect Dis.* 1999 Jul;29(1):106-12.
- Moss WJ, Fisher C, Scott S, Monze M, Ryon JJ, Quinn TC, et al. HIV type 1 infection is a risk factor for mortality in hospitalized Zambian children with measles. *Clin Infect Dis.* 2008 Feb 15;46(4):523-7.
- Moss WJ, Griffin DE. Global measles elimination. *Nat Rev Microbiol.* 2006 Dec;4(12):900-8.
- Moss WJ, Griffin DE. Measles. *Lancet.* 2011 Jan 14;379(9811):153-64.
- Moss WJ, Monze M, Ryon JJ, Quinn TC, Griffin DE, Cutts F. Prospective study of measles in hospitalized, human immunodeficiency virus (HIV)-infected and HIV-uninfected children in Zambia. *Clin Infect Dis.* 2002 Jul 15;35(2):189-96.
- Moulin E, Beal V, Jeantet D, Horvat B, Wild F, Waku-Kouomou D. Molecular Characterization of measles virus strains causing subacute sclerosing Panencephalitis in France in 1977 and 2007 *J Med Virol.* 2011;83:1614-23.
- Moussallem TM, Guedes F, Fernandes ER, Pagliari C, Lancellotti CL, de Andrade HF, Jr., et al. Lung involvement in childhood measles: severe immune dysfunction revealed by quantitative immunohistochemistry. *Hum Pathol.* 2007 Aug;38(8):1239-47.
- Muhlebach MD, Mateo M, Sinn PL, Pruffer S, Uhlig KM, Leonard VH, et al. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature.* 2011 Dec 22;480(7378):530-3.
- Mulders MN, Nebie YK, Fack F, Kapitanyuk T, Sanou O, Valea DC, et al. Limited diversity of measles field isolates after a national immunization day in Burkina Faso: progress from endemic to epidemic transmission? *J Infect Dis.* 2003 May 15;187 Suppl 1:S277-82.
- Mulders MN, Truong AT, Muller CP. Monitoring of measles elimination using molecular epidemiology. *Vaccine.* 2001 Mar 21;19(17-19):2245-9.
- Murabayashi N, Kurita-Taniguchi M, Ayata M, Matsumoto M, Ogura H, Seya T. Susceptibility of human dendritic cells (DCs) to measles virus (MV) depends on their activation stages in conjunction with the level of CDw150: role of Toll stimulators in DC maturation and MV amplification. *Microbes Infect.* 2002 Jul;4(8):785-94.

Mustafa MM, Weitman SD, Winick NJ, Bellini WJ, Timmons CF, Siegel JD. Subacute measles encephalitis in the young immunocompromised host: report of two cases diagnosed by polymerase chain reaction and treated with ribavirin and review of the literature. *Clin Infect Dis*. 1993 May;16(5):654-60.

Muwonge A, Nanyunja M, Rota PA, Bwogi J, Lowe L, Liffick SL, et al. New measles genotype, Uganda. *Emerg Infect Dis*. 2005 Oct;11(10):1522-6.

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

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

Na B-K, Lee J-S, Shin GC, Shin JM, Lee J-Y, Chung J-K, et al. Sequence analysis of hemagglutinin and nucleoprotein genes of measles viruses isolated in Korea during the 2000 epidemic. *Virus Res*. 2001;81:143-8.

Nair N, Moss WJ, Scott S, Mugala N, Ndhlovu ZM, Lilo K, et al. HIV-1 infection in Zambian children impairs the development and avidity maturation of measles virus-specific immunoglobulin G after vaccination and infection. *J Infect Dis*. 2009 Oct 1;200(7):1031-8.

Nandy R, Handzel T, Zaneidou M, Biey J, Cuddy RZ, Perry R, et al. Case-fatality rate during a measles outbreak in eastern Niger in 2003. *Clin Infect Dis*. 2006 Feb 1;42(3):322-8.

Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rabourdin-Combe C, et al. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol*. 1993 Oct;67(10):6025-32.

Naniche D, Wild TF, Rabourdin-Combe C, Gerlier D. A monoclonal antibody recognizes a human cell surface glycoprotein involved in measles virus binding. *J Gen Virol*. 1992 Oct;73 (Pt 10):2617-24.

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

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

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

Navaratnarajah CK, Vongpunsawad S, Oezguen N, Stehle T, Braun W, Hashiguchi T, et al. Dynamic interaction of the measles virus hemagglutinin with its receptor signaling lymphocytic activation molecule (SLAM, CD150). *J Biol Chem.* 2008 Apr 25;283(17):11763-71.

Nigatu W, Jin L, Cohen BJ, Nokes DJ, Etana M, Cutts FT, et al. Measles virus strains circulating in Ethiopia in 1998-1999: molecular characterisation using oral fluid samples and identification of a new genotype. *J Med Virol.* 2001 Oct;65(2):373-80.

Norrby E, Enders-Ruckle G, Meulen V. Differences in the appearance of antibodies to structural components of measles virus after immunization with inactivated and live virus. *J Infect Dis.* 1975 Sep;132(3):262-9.

Norrby E, Gollmar Y. Identification of measles virus-specific hemolysis-inhibiting antibodies separate from hemagglutination-inhibiting antibodies. *Infect Immun.* 1975 Feb;11(2):231-9.

Norrby E. Occurrence of antibodies against envelope components after immunization with formalin inactivated and live measles vaccine. *J Biol Stand.* 1975;3(4):375-80.

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

Ogura H, Sato H, Kamiya S, Nakamura S. Glycosylation of measles virus haemagglutinin protein in infected cells. *J Gen Virol.* 1991 Nov;72 (Pt 11):2679-84.

Ohgimoto S, Ohgimoto K, Niewiesk S, Klagge IM, Pfeuffer J, Johnston IC, et al. The haemagglutinin protein is an important determinant of measles virus tropism for dendritic cells in vitro. *J Gen Virol.* 2001 Aug;82(Pt 8):1835-44.

Okada H, Kobune F, Sato TA, Kohama T, Takeuchi Y, Abe T, et al. Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch Virol.* 2000;145(5):905-20.

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

Okuno Y, Ueda S, Kurimura T, Suzuki N, Yamanishi K. Studies on further attenuated liver measles vaccine. VII. Development and evaluation of CAM-70 measles virus vaccine. *Biken J.* 1971 Sep;14(3):253-8.

Oldstone MB, Dales S, Tishon A, Lewicki H, Martin L. A role for dual viral hits in causation of subacute sclerosing panencephalitis. *J Exp Med.* 2005 Nov 7;202(9):1185-90.

Olive JM, da Silva C, Carrasco P, de Quadros CA. Expanded Program on Immunization in the Americas. *Infect Dis Clin Pract.* 1995;4:157-61.

Oliveira MI, Rota PA, Curti SP, Figueiredo CA, Afonso AM, Theobaldo M, et al. Genetic homogeneity of measles viruses associated with a measles outbreak, Sao Paulo, Brazil, 1997. *Emerg Infect Dis.* 2002 Aug;8(8):808-13.

Ono N, Tatsuo H, Hidaka Y, Aoki T, Minagawa H, Yanagi Y. Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. *J Virol.* 2001 May;75(9):4399-401.

Oshiro S, Minema H, Shiroma N, Hirayasu K, Nakada Y. [Five patients with subacute sclerosing panencephalitis treated with intraventricular alpha-interferon and inosinpranobex]. *No To Hattatsu.* 2004 Jan;36(1):70-4.

Ota MO, Moss WJ, Griffin DE. Emerging diseases: measles. *J Neurovirol.* 2005 Oct;11(5):447-54.

Outlaw MC, Pringle CR. Sequence variation within an outbreak of measles virus in the Coventry area during spring/summer 1993. *Virus Res.* 1995 Nov;39(1):3-11.

PAHO. International Symposium on Measles Immunization, Washington, D.C. *Rev Infect Dis.* 1983;5:389-625.

PAHO. Measles in the region of the Americas 1971-1978. *EPI News.* 1979;1:4-5.

Pal GK, Pal P, Nanda N, Lalitha V, Dutta TK, Adithan C. Effect of gender on sympathovagal imbalance in prehypertensives. *Clin Exp Hypertens.* 2011;34(1):31-7.

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

Panum P. Observation made during the epidemic of measles on the Faroe Island in the year 1846. *Med Class.* 1939;3:829-86.

Parker ME, Chabot S, Ward BJ, Johns T. Traditional dietary additives of the Maasai are antiviral against the measles virus. *J Ethnopharmacol.* 2007 Nov 1;114(2):146-52.

Parks CL, Lerch RA, Walpita P, Wang HP, Sidhu MS, Udem SA. Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol.* 2001 Jan;75(2):910-20.

Partidos CD, Stanley CM, Steward MW. Immune responses in mice following immunization with chimeric synthetic peptides representing B and T cell epitopes of measles virus proteins. *J Gen Virol.* 1991 Jun;72 (Pt 6):1293-9
Peries JR, Chany C. Studies on measles viral hemagglutination. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1962 Jul;110:477-82.

Peltola H, Patja A, Leinikki P, Valle M, Davidkin I, Paunio M. No evidence for measles, mumps, and rubella vaccine-associated inflammatory bowel disease or autism in a 14-year prospective study. *Lancet.* 1998 May 2;351(9112):1327-8.

Peradze TV, Smorodintsev AA. Epidemiology and specific prophylaxis of measles. *Rev Infect Dis.* 1983 May-Jun;5(3):487-90.

Permar SR, Griffin DE, Letvin NL. Immune containment and consequences of measles virus infection in healthy and immunocompromised individuals. *Clin Vaccine Immunol.* 2006 Apr;13(4):437-43.

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

Plemper RK, Snyder JP. Measles control--can measles virus inhibitors make a difference? *Curr Opin Investig Drugs.* 2009 Aug;10(8):811-20.

Poch O, Blumberg BM, Bougueleret L, Tordo N. Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol.* 1990 May;71 (Pt 5):1153-62.

Quadros CA, Hersh BS, Nogueira AC, Carrasco PA, Silveira CM. Measles eradication: experience in the Americas. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1999;48:57-64.

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

Reuter D, Schneider-Schaulies J. Measles virus infection of the CNS: human disease, animal models, and approaches to therapy. *Med Microbiol Immunol.* 2010 Aug;199(3):261-71.

Reutter GL, Cortese-Grogan C, Wilson J, Moyer SA. Mutations in the measles virus C protein that up regulate viral RNA synthesis. *Virology.* 2001 Jun 20;285(1):100-9.

Richard JL, Masserey Spicher V. Large measles epidemic in Switzerland from 2006 to 2009: consequences for the elimination of measles in Europe. *Euro Surveill.* 2009;14(50).

Richardson C, Hull D, Greer P, Hasel K, Berkovich A, Englund G, et al. The nucleotide sequence of the mRNA encoding the fusion protein of measles virus (Edmonston strain): a comparison of fusion proteins from several different paramyxoviruses. *Virology.* 1986 Dec;155(2):508-23.

Riddell MA, Rota JS, Rota PA. Review of the temporal and geographical distribution of measles virus genotypes in the prevaccine and postvaccine eras. *Virol J.* 2005;2:87.

Rima BK, Duprex WP. Molecular mechanisms of measles virus persistence. *Virus Res.* 2005 Aug;111(2):132-47.

Rima BK, Duprex WP. Morbilliviruses and human disease. *J Pathol.* 2006 Jan;208(2):199-214.

Rima BK, Earle JA, Baczko K, ter Meulen V, Liebert UG, Carstens C, et al. Sequence divergence of measles virus haemagglutinin during natural evolution and adaptation to cell culture. *J Gen Virol.* 1997 Jan;78 (Pt 1):97-106.

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

Rota JS, Heath JL, Rota PA, King GE, Celma ML, Carabana J, et al. Molecular epidemiology of measles virus: identification of pathways of transmission and implications for measles elimination. *J Infect Dis.* 1996 Jan;173(1):32-7.

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

Rota JS, Rota PA, Redd SB, Redd SC, Pattamadilok S, Bellini WJ. Genetic analysis of measles viruses isolated in the United States, 1995-1996. *J Infect Dis.* 1998 Jan;177(1):204-8.

Rota PA, Bellini WJ. Update on the global distribution of genotypes of wild type measles viruses. *J Infect Dis.* 2003 May 15;187 Suppl 1:S270-6.

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

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

Rota PA, Brown KE, Hubschen JM, Muller CP, Icenogle J, Chen MH, et al. Improving global virologic surveillance for measles and rubella. *J Infect Dis.* 2011 Jul;204 Suppl 1:S506-13.

Rota PA, Featherstone DA, Bellini WJ. Molecular Epidemiology of Measles Virus. In: Griffin DE, Oldstone MB, editors. *Measles – Pathogenesis and Control.* Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2009. p. 129-50.

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

Rota PA, Liffick S, Rosenthal S, Heriyanto B, Chua KB. Measles genotype G2 in Indonesia and Malaysia. *Lancet.* 2000 Apr 29;355(9214):1557-8.

Ryon JJ, Moss WJ, Monze M, Griffin DE. Functional and phenotypic changes in circulating lymphocytes from hospitalized zambian children with measles. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 Sep;9(5):994-1003.

Saito H, Nakagomi O, Morita M. Molecular identification of two distinct hemagglutinin types of measles virus by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Mol Cell Probes*. 1995 Feb;9(1):1-8.

Santiago C, Bjorling E, Stehle T, Casasnovas JM. Distinct kinetics for binding of the CD46 and SLAM receptors to overlapping sites in the measles virus hemagglutinin protein. *J Biol Chem*. 2002 Aug 30;277(35):32294-301.

Santibanez S, Heider A, Gerike E, Agafonov A, Schreier E. Genotyping of measles virus isolates from central Europe and Russia. *J Med Virol*. 1999 Jul;58(3):313-20.

Santibanez S, Niewiesk S, Heider A, Schneider-Schaulies J, Berbers GA, Zimmermann A, et al. Probing neutralizing-antibody responses against emerging measles viruses (MVs): immune selection of MV by H protein-specific antibodies? *J Gen Virol*. 2005 Feb;86(Pt 2):365-74.

Santos JI, Nakamura MA, Godoy MV, Kuri P, Lucas CA, Conyer RT. Measles in Mexico, 1941-2001: interruption of endemic transmission and lessons learned. *J Infect Dis*. 2004 May 1;189 Suppl 1:S243-50.

Sato H, Yoneda M, Honda T, Kai C. Morbillivirus receptors and tropism: multiple pathways for infection. *Front Microbiol*. 2012;3:75.

Sato TA, Kohama T, Sugiura A. Intracellular processing of measles virus fusion protein. *Arch Virol*. 1988;98(1-2):39-50.

Scharg SJ, Rota PA, Bellini WJ. Spontaneous mutation rate of measles virus: direct estimation based on mutations conferring monoclonal antibody resistance *J virol*. 1999;73:51-4.

Schmid D, Holzmann H, Abele S, Kasper S, Konig S, Meusburger S, et al. An ongoing multi-state outbreak of measles linked to non-immune anthroposophic communities in Austria, Germany, and Norway, March-April 2008. *Euro Surveill*. 2008 Apr 17;13(16).

Schneider H, Kaelin K, Billeter MA. Recombinant measles viruses defective for RNA editing and V protein synthesis are viable in cultured cells. *Virology*. 1997 Jan 20;227(2):314-22.

Schneider-Schaulies J, Schnorr JJ, Schlender J, Dunster LM, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. Receptor (CD46) modulation and complement-mediated lysis of uninfected cells after contact with measles virus-infected cells. *J Virol*. 1996 Jan;70(1):255-63.

Schneider-Schaulies S, Dittmer U. Silencing T cells or T-cell silencing: concepts in virus-induced immunosuppression. *J Gen Virol*. 2006 Jun;87(Pt 6):1423-38.

Schneider-Schaulies S, Klagge IM, ter Meulen V. Dendritic cells and measles virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2003;276:77-101.

Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. Measles virus and immunomodulation: molecular bases and perspectives. *Expert Rev Mol Med*. 2002 May;4(13):1-18.

Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. Measles Virus. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Schoub BD, Griffiths PD, Mortimer P, editors. *Principles and practice of Clinical Virology*. 6th ed. UK: John Wiley and sons; 2009. p. 533-59.

Secretaria de Vigilância em Saúde M. Nota Técnica Nº6/2011 - Recomendações frente aos cenários epidemiológicos internacionais e nacionais de sarampo e rubéola, 2011.

Secretária de Vigilância em Saúde M. Relatório da verificação dos critérios de eliminação da transmissão dos vírus endêmicos do sarampo e rubéola e da síndrome da rubéola congênita (SRC) no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2010 [cited 2012. Available from: portal.saude.gov.br/portal/.../livro_relatorio_rubeola_2010_116pgs.p.

Secretaria de Vigilância em Saúde M. Sarampo. In: Saúde Md, editor. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 7ª edição ed. Brasília; 2009. p. 19-37.

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

Shaffer JA, Bellini WJ, Rota PA. The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology*. 2003 Oct 25;315(2):389-97.

Shulga SV, Rota PA, Kremer JR, Naumova MA, Muller CP, Tikhonova NT, et al. Genetic variability of wild-type measles viruses, circulating in the Russian Federation during the implementation of the National Measles Elimination Program, 2003-2007. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Jun;15(6):528-37.

Sidhu MS, Menonna JP, Cook SD, Dowling PC, Udem SA. Canine distemper virus L gene: sequence and comparison with related viruses. *Virology*. 1993 Mar;193(1):50-65.

Sidorenko SP, Clark EA. Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. *J Immunol*. 1993 Nov 1;151(9):4614-24.

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

Sleeman K, Stein DA, Tamin A, Reddish M, Iversen PL, Rota PA. Inhibition of measles virus infections in cell cultures by peptide-conjugated morpholino oligomers. *Virus Res*. 2009 Mar;140(1-2):49-56.

Smit SB, Hardie D, Tiemessen CT. Measles virus genotype B2 is not inactive: evidence of continued circulation in Africa. *J Med Virol*. 2005 Dec;77(4):550-7.

Stogner SW, King JW, Black-Payne C, Bocchini J. Ribavirin and intravenous immune globulin therapy for measles pneumonia in HIV infection. *South Med J*. 1993 Dec;86(12):1415-8.

Strebel PM, Henao-Restrepo AM, Hoekstra E, Olive JM, Papania MJ, Cochi SL. Global measles elimination efforts: the significance of measles elimination in the United States. *J Infect Dis.* 2004 May 1;189 Suppl 1:S251-7.

Strimmer K, Moulton V. Likelihood analysis of phylogenetic networks using directed graphical models. *Mol Biol Evol.* 2000 Jun;17(6):875-81.

Suringa DW, Bank LJ, Ackerman AB. Role of measles virus in skin lesions and Koplik's spots. *N Engl J Med.* 1970 Nov 19;283(21):1139-42.

Suzuki K, Morita M, Katoh M, Kidokoro M, Saika S, Yoshizawa S, et al. Development and evaluation of the TD97 measles virus vaccine. *J Med Virol.* 1990 Nov;32(3):194-201.

Tahara M, Takeda M, Shirogane Y, Hashiguchi T, Ohno S, Yanagi Y. Measles virus infects both polarized epithelial and immune cells by using distinctive receptor-binding sites on its hemagglutinin. *J Virol.* 2008 May;82(9):4630-7.

Takasu T, Mgone JM, Mgone CS, Miki K, Komase K, Namae H, et al. A continuing high incidence of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) in the Eastern Highlands of Papua New Guinea. *Epidemiol Infect.* 2003 Oct;131(2):887-98.

Takeda M, Tahara M, Hashiguchi T, Sato TA, Jinnouchi F, Ueki S, et al. A human lung carcinoma cell line supports efficient measles virus growth and syncytium formation via a SLAM- and CD46-independent mechanism. *J Virol.* 2007 Nov;81(21):12091-6.

Takeuchi K, Kadota SI, Takeda M, Miyajima N, Nagata K. Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett.* 2003 Jun 19;545(2-3):177-82.

Takeuchi K, Nagata N, Kato SI, Ami Y, Suzaki Y, Suzuki T, et al. Wild-type measles virus with the hemagglutinin protein of the edmonston vaccine strain retains wild-type tropism in macaques. *J Virol.* 2012 Mar;86(6):3027-37.

Tamin A, Rota PA, Wang ZD, Heath JL, Anderson LJ, Bellini WJ. Antigenic analysis of current wild type and vaccine strains of measles virus. *J Infect Dis.* 1994 Oct;170(4):795-801.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011 Oct;28(10):2731-9.

Tanaka K, Minagawa H, Xie MF, Yanagi Y. The measles virus hemagglutinin downregulates the cellular receptor SLAM (CD150). *Arch Virol.* 2002;147(1):195-203.

Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature.* 2000 Aug 24;406(6798):893-7.

Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol.* 2001 Jul;75(13):5842-50.

- Taylor MJ, Godfrey E, Baczko K, ter Meulen V, Wild TF, Rima BK. Identification of several different lineages of measles virus. *J Gen Virol.* 1991 Jan;72 (Pt 1):83-8.
- Tomoda A, Nomura K, Shiraishi S, Miike T, Hamada A, Hosoya M. [Trial of intraventricular ribavirin and interferon-alpha combination therapy for subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) in Japan]. *No To Hattatsu.* 2003 Jul;35(4):321-6.
- Truong AT, Kreis S, Ammerlaan W, Hartter HK, Adu F, Omilabu SA, et al. Genotypic and antigenic characterization of hemagglutinin proteins of African measles virus isolates. *Virus Res.* 1999 Jul;62(1):89-95.
- Vaidya SR, Wairagkar NS, Raja D, Khedekar DD, Gunasekaran P, Shankar S, et al. First detection of measles genotype D7 from India. *Virus Genes.* 2008 Feb;36(1):31-4. . 2008
- van der Vlist M, de Witte L, de Vries RD, Litjens M, de Jong MA, Fluitsma D, et al. Human Langerhans cells capture measles virus through Langerin and present viral antigens to CD4(+) T cells but are incapable of cross-presentation. *Eur J Immunol.* 2011 Sep;41(9):2619-31.
- Veillette A. NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adapters. *Immunol Rev.* 2006 Dec;214:22-34.
- Villamor E, Fawzi WW. Effects of vitamin a supplementation on immune responses and correlation with clinical outcomes. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Jul;18(3):446-64.
- Vongpunsawad S, Oezgun N, Braun W, Cattaneo R. Selectively receptor-blind measles viruses: Identification of residues necessary for SLAM- or CD46-induced fusion and their localization on a new hemagglutinin structural model. *J Virol.* 2004 Jan;78(1):302-13.
- Wachsman MB, Ramirez JA, Galagovsky LR, Coto CE. Antiviral activity of brassinosteroids derivatives against measles virus in cell cultures. *Antivir Chem Chemother.* 2002 Jan;13(1):61-6.
- Wairagkar N, Rota PA, Liffick S, Shaikh N, Padbidri VS, Bellini WJ. Characterization of measles sequences from Pune, India. *J Med Virol.* 2002 Dec;68(4):611-4.
- Waku-Kouomou D, Freymuth F, du Chatelet IP, Wild TF, Horvat B. Co-circulation of multiple measles virus genotypes during an epidemic in France in 2008. *J Med Virol.* 2010 May;82(6):1033-43.
- Waku-Kouomou D, Landreau D, Olivier S, Palmyre P, Benoit-Catin T, Freymuth F, et al. Molecular characterization of measles virus circulating in the Indian Ocean Islands during 2005-2006 and in France in 2006. *J Med Virol.* 2007 Sep;79(9):1381-7.
- Waldman EA, Camargo MCC. Current Status of measles in Brazil. 1980-1995. *Virus Ver Res.* 1996;1:67-74.

Ward BJ, Johnson RT, Vaisberg A, Jauregui E, Griffin DE. Cytokine production in vitro and the lymphoproliferative defect of natural measles virus infection. *Clin Immunol Immunopathol.* 1991 Nov;61(2 Pt 1):236-48.

Wardrop EA, Briedis DJ. Characterization of V protein in measles virus-infected cells. *J Virol.* 1991 Jul;65(7):3421-8.

Watanabe M, Hirano A, Stenglein S, Nelson J, Thomas G, Wong TC. Engineered serine protease inhibitor prevents furin-catalyzed activation of the fusion glycoprotein and production of infectious measles virus. *J Virol.* 1995 May;69(5):3206-10.

White LK, Yoon JJ, Lee JK, Sun A, Du Y, Fu H, et al. Nonnucleoside inhibitor of measles virus RNA-dependent RNA polymerase complex activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Jul;51(7):2293-303.

White RG, Boyd JF. The effect of measles on the thymus and other lymphoid tissues. *Clin Exp Immunol.* 1973 Mar;13(3):343-57.

WHO WHO. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. Geneva, Switzerland: Expanded Programme on Immunization (EPI) team of the Department of Immunization, Vaccines and Biologicals; 2007.

WHO. Measles Outbreaks: regions of Americas, Europe and Africa. 2011. Acessado em outubro de 2011. Disponível em: http://www.who.int/csr/don/2011_10_07/en/index.html.

WHO. Measles Surveillance data. World Health Organization; 2012 [atualizado em 16/10/2012. Acessado: 02 de Novembro de 2012. Disponível em: http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/measles_monthlydata/en/index.html

WHO. Measles virus nomenclature update: 2012. *Wkly Epidemiol Rec.* 2012 Mar 2;87(9):73-81.

WHO. Nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles virus (update). *Wkly Epidemiol Rec.* 2001;33(Part II):249-51.

WHO. Update of the nomenclature for describing the genetic characteristic of wild-type measles viruses: new genotypes and reference strains. *Wkly Epidemiol Rec.* 2003 July 2003;78(27):229-40.

WHO. WHO Epidemiological Brief-Europe. 2011 Date; (N. 13). Acessado em 10 de Novembro de 2012. Disponível online em: <http://www.euro.who.int>.

WHO. World Health Organization. Fact Sheet N°286. April 2012.

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

Wilson GS. Measles as a universal disease. *Am J Dis Child.* 1962;103:219-23.

- Witko SE, Kotash C, Sidhu MS, Udem SA, Parks CL. Inhibition of measles virus minireplicon-encoded reporter gene expression by V protein. *Virology*. 2006 Apr 25;348(1):107-19.
- Wolfson LJ, Grais RF, Luquero FJ, Birmingham ME, Strebel PM. Estimates of measles case fatality ratios: a comprehensive review of community-based studies. *Int J Epidemiol*. 2009 Feb;38(1):192-205.
- Wyde PR. Chemotherapy of respiratory viruses: prospects and challenges. *Drug Resist Updat*. 1999 Aug;2(4):244-58.
- Xu W, Tamin A, Rota JS, Zhang L, Bellini WJ, Rota PA. New genetic group of measles virus isolated in the People's Republic of China. *Virus Res*. 1998 Apr;54(2):147-56.
- Yanagi Y, Takeda M, Ohno S. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol*. 2006 Oct;87(Pt 10):2767-79.
- Yokota S, Saito H, Kubota T, Yokosawa N, Amano K, Fujii N. Measles virus suppresses interferon-alpha signaling pathway: suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon-alpha receptor complex. *Virology*. 2003 Feb 1;306(1):135-46.
- Zhang X, Bourhis JM, Longhi S, Carsillo T, Buccellato M, Morin B, et al. Hsp72 recognizes a P binding motif in the measles virus N protein C-terminus. *Virology*. 2005 Jun 20;337(1):162-74.
- Zhang Y, Zhu Z, Rota PA, Jiang X, Hu J, Wang J, et al. Molecular epidemiology of measles viruses in China, 1995-2003. *Virol J*. 2007;4:14.
- Zhang Y, Ding Z, Wang H, Li L, Pang Y, Brown KE, et al. New measles virus genotype associated with outbreak, China. *Emerg Infect Dis*. 2010 Jun;16(6):943-7.
- Zhu YD, Heath J, Collins J, Greene T, Antipa L, Rota P, et al. Experimental measles. II. Infection and immunity in the rhesus macaque. *Virology*. 1997 Jun 23;233(1):85-92.
- Ziegler D, Fournier P, Berbers GA, Steuer H, Wiesmuller KH, Fleckenstein B, et al. Protection against measles virus encephalitis by monoclonal antibodies binding to a cystine loop domain of the H protein mimicked by peptides which are not recognized by maternal antibodies. *J Gen Virol*. 1996 Oct;77 (Pt 10):2479-89.