

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Doutorado em Biologia Celular e Molecular

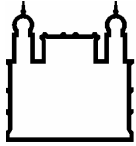
CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E BIOLÓGICA DO VÍRUS DO SARAMPO
CEPA VACINAL CAM-70

MARIA BEATRIZ JUNQUEIRA BORGES
Dezembro de 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MARIA BEATRIZ JUNQUEIRA BORGES

Caracterização Genômica e Biológica do Vírus do Sarampo Cepa Vacinal CAM-70

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Orientadores: Dr. Akira Homma
Dr. Ricardo Galler

RIO DE JANEIRO

2007

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

B732

Borges, Maria Beatriz Junqueira

Caracterização genômica e biológica do vírus do sarampo cepa vacinal CAM-70 / Maria Beatriz Junqueira Borges. – Rio de Janeiro, 2007.

xvi, 150 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2007.

Bibliografia: f. 70-84

1. Vírus do Sarampo. 2. CAM-70 3. Fibroblastos de embrião de galinha 4. Seqüência. 5. Interferon. 6. 2-5 OAS. I. Título.

CDD 616.915

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MARIA BEATRIZ JUNQUEIRA BORGES

Caracterização Genômica e Biológica do Vírus do Sarampo Cepa Vacinal CAM-70

ORIENTADORES: Prof. Dr. Akira Homma
Prof. Dr. Ricardo Galler

Aprovada em: / /

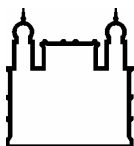
EXAMINADORES:

Prof. Dr. Ana Maria Coimbra Gaspar - Presidente

Prof. Dr. Claudia Lamarca Vitral

Prof. Dr. Christian Niel

Rio de Janeiro, 18 de Dezembro de 2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E BIOLÓGICA DO VÍRUS DO SARAMPO CEPA VACINAL CAM-70

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Maria Beatriz Junqueira Borges

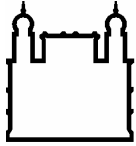
Bio-Manguinhos possui a capacidade instalada de produção da vacina contra o sarampo utilizando a cepa viral Biken CAM-70. No momento, esta vacina não está sendo produzida devido à utilização, pelo Ministério da Saúde, da vacina tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola) nas campanhas de vacinação. Entretanto, o potencial de atender a mercados externos com uma vacina monovalente contra o sarampo, faz com que, a qualquer momento, a produção seja retomada. Neste contexto, a caracterização genômica e biológica deste vírus vacinal pode contribuir para a introdução de melhorias no processo de produção e nos fornecer dados para um maior conhecimento do nosso produto.

Para avaliar a estabilidade genética da cepa CAM-70 foram realizadas dez passagens do vírus semente FMS-7 em culturas primárias de embrião de galinha (“chicken embryo fibroblast” = CEF). Os genomas do vírus semente FMS-7, do vírus proveniente do frasco de vacina (correspondente à 3ª passagem = VSF-3) e da 10ª passagem (VSF-10) foram seqüenciados e comparados entre si e com as seqüências disponíveis de vacinas de sarampo. O resultado do seqüenciamento nucleotídico direto de FMS-7, VSF-3 e VSF-10 revelou seqüências genômicas idênticas, demonstrando uma grande estabilidade genética deste vírus nas condições de cultivo empregadas.

Neste trabalho investigamos também a influência do interferon (IFN) no rendimento viral. Culturas de CEF em alta densidade (AD) e baixa densidade (BD) celular foram inoculadas com CAM-70 e coletadas diariamente por um período de até 15 dias. As suspensões provenientes destas culturas foram tituladas em um teste para detecção de IFN e avaliados quanto à expressão da enzima 2-5 oligoadenilato sintetase (2-5OAS). O vírus CAM-70 foi capaz de induzir a produção de IFN em CEF, como foi demonstrado através dos

ensaios de titulação e pela expressão gênica de 2-5 OAS. A obtenção de títulos virais mais elevados em BD sugere que este vírus seja sensível ao IFN.

O resultado obtido nos ensaios de IFN recomenda a produção da vacina em culturas em BD para o alcance de maiores rendimentos virais. Este estudo também demonstra que o vírus CAM-70 é altamente estável do ponto de vista genético, dentro dos parâmetros de produção. Esta estabilidade permite a extensão do uso dos lotes sementes de vacina e contribui para o perfil de segurança da vacina contra o sarampo confeccionada com o vírus CAM-70.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E BIOLÓGICA DO VÍRUS DO SARAMPO CEPA VACINAL CAM-70

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Maria Beatriz Junqueira Borges

Bio-Manguinhos has the competence for producing a measles vaccine using the Biken CAM-70 strain. Since the Ministry of Health adopted the MMR vaccine for vaccination campaigns, the production of the monovalent measles vaccine was discontinued. However, the export potential of a monovalent measles vaccine justifies the restart of production. Therefore, the genomic and biological characterization of this vaccine virus may greatly contribute to the introduction of improvements in the production process and in providing data for the knowledge of our product.

To evaluate the genetic stability of the CAM-70 measles vaccine strain we have performed ten serial passages of the seed lot virus FMS-7 in chicken embryo fibroblasts primary cultures (CEF) under production conditions. The nucleotide sequences of the seed lot virus, the virus from a vaccine vial (third passage) and from the tenth passage were determined and compared with each other and with all available measles vaccine sequences. The results obtained for the seed virus FMS-7, for the virus from a vaccine lot (third passage) and passage ten have revealed identical genomic sequences and demonstrate that the measles CAM-70 vaccine virus is highly adapted to its cultivation conditions and genetically stable under these conditions.

In this study we have also investigated the influence of interferon (IFN) in virus yields. CEF cultures in high density (HD) and low density (LD) were inoculated with the CAM-70 virus and collected daily for up to 10 days. The suspensions originated from these cultures were titrated in a test for IFN detection and evaluated for the expression of the enzyme 2-5 oligoadenilate synthetase (2-5OAS). The CAM-70 virus was able to induce the production of IFN in CEF as demonstrated by the IFN titration assays and the expression of 2-

5 OAS. The observation of higher virus titers in LD cultures suggests that this virus is sensitive to IFN.

IFN results recommend the production of vaccine in LD cultures for the achievement of higher virus yields. This study also demonstrates that the CAM-70 virus is highly stable from the genetic point of view, under production conditions. This stability allows the extension of the use of the seed lots and contributes for the safety profile of the measles vaccine manufactured with the CAM-70 strain.

Aos meus pais, Carlos (*in memoriam*) e
Renata.

Aos meus filhos Lucas e João.

Ao meu marido Luís Henrique.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar e acima de tudo, agradeço a Deus que nunca me desampara e que em diversos momentos me carrega ao colo. Agradeço imensamente, também, a seus enviados pelo apoio amoroso e pela presença constante;

À direção de Bio-Manguinhos pelo suporte na realização deste estudo;

À Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, em especial ao Dr. Milton Ozório Moraes e Daniele Lobato, pela atenção e paciência;

Aos membros da banca, que gentilmente concordaram em participar da análise desta tese;

A Dra. Jussara Nascimento (*in memoriam*), que sempre promoveu o estudo da CAM-70, por acreditar que eu podia conduzir este trabalho e pelos anos de rica e edificante convivência;

Ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite por me ouvir e aconselhar;

À Dra. Márcia Terezinha Baroni pela orientação inicial deste estudo;

Ao Dr. Akira Homma e Dr. Ricardo Galler por aceitarem assumir esta orientação;

À Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar que participou ativamente de minha formação profissional e que permanece, até hoje, como meu maior exemplo de bom-senso e visão, pelos bons conselhos e pela sua enorme contribuição na revisão desta tese;

À Dra. Jaqueline Mendes de Oliveira, pelo minucioso trabalho de correção;

Ao amigo e chefe, Dr. Marcos da Silva Freire, pelo estímulo e confiança;

À minha querida amiga Dra. Elena Caride, que aceita e cumpre com afinco e dedicação, a missão de buscar e transmitir o saber, por trazer ao grupo do LATEV, e especialmente a mim, sua vibração contagiante. Seu auxílio tornou tudo mais fácil e prazeroso;

Ao amigo Alfredo Jabor, meu grande parceiro na realização deste trabalho, por tudo o que me ensinou e pela sempre tão generosa ajuda;

Ao Laboratório de Febre Amarela pelo fornecimento de ovos SPF;

Ao Laboratório de Sarampo, nas pessoas de Mariza Cristina Lima e Teresinha Elisa de Brito, pela sempre pronta colaboração em disponibilizar espaço, material e pessoal;

Ao amigo José Marcus Malachias, exemplo de compromisso e competência na realização de suas atividades, por ter compartilhado comigo toda a etapa de preparo de células primárias e passagem do vírus vacinal;

Ao Setor de Apoio Geral, em especial ao colega João Antônio Silva, pela presteza e esmero na confecção e encadernamento das cópias;

À colega Maria Luíza Borges de Azevedo pela solidariedade e carinho;

Aos amigos Gerson, Marlon, Adriana e Emanuele pelo empenho no preparo dos cultivos celulares;

À amiga Dra. Márcia Archer, pela preciosa ajuda na conferência da bibliografia;

À Anna Yamamura, amiga com que sempre pude contar, pelo carinho e a amizade de tantos anos;

A Luiz Fernando Carvalho de Almeida, parceiro nas titulações e amigo para todas as horas;

À Dra. Luciane Pinto Gaspar, uma pessoa muito especial, que sempre torceu por mim;

Aos amigos Edney do Monte e seu discípulo Max Areas, pela presteza e competência na montagem, esterilização e organização do material de laboratório;

Ao amigo Idevaldo Inácio Ferreira, pela valiosa assistência prestada no setor de Biologia Molecular;

Aos amigos Dra. Marta Cristina de Oliveira Souza e Álvaro José Boareto Mendes pelas excelentes dicas e palavras de incentivo;

À amiga Dra. Aymara Rangel, que me ajudou a imprimir e montar as inúmeras cópias desta tese, pela convivência fraterna;

À amiga Emily Hime Miranda, profissional interessada e ávida por aprender, pela sua sempre pronta disposição de ajudar;

Ao grupo do LATEV como um todo, incluindo aqueles que partiram para outros laboratórios, pelo apoio e pelo convívio agradável e divertido;

À Leda, minha filha postiça e meu braço direito, por tornar minha rotina doméstica mais suave e assim permitir que eu me dedicasse mais integralmente ao trabalho;

Aos meus filhos, por compreenderem minha ausência, e por serem minha maior razão de viver;

Ao meu marido, Luís Henrique, que com sua presença firme e serena, caminha comigo de mãos dadas pela estrada da vida, e torna minha existência muito mais feliz;

À minha mãe, Renata, exemplo de superação e bondade, agradeço o privilégio de ser sua filha;

À D. Emília e Helô, minha segunda família, por facilitarem tanto minha vida;

Aos meus companheiros, Nicolau, Rufus e Violeta, pela amizade incondicional.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Apresentação clínica do sarampo e epidemiologia.....	1
1.2 Epidemiologia do sarampo no Brasil.....	5
1.3 Vacinas	8
1.3.1 Origem e desenvolvimento.....	8
1.3.2 Vacina inativada	8
1.3.3 Vacinas atenuadas.....	8
1.3.4 Limitações ao uso das vacinas atuais	11
1.3.5 Vacina CAM-70	12
1.3.6 Perspectivas para novas vacinas	14
1.4 Agente infeccioso	15
1.5 Organização genômica e proteínas	16
1.6 Replicação viral	18
1.7 Genótipos.....	22
1.8 Interferon	23
2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivos gerais	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Vírus	27
4.1.1 Vírus CAM-70.....	27
4.1.2 Vírus Sindbis	27
4.2. Meios de Cultura e Soluções	28
4.3. Culturas celulares	35
4.3.1 Preparo de culturas de fibroblastos de embrião de galinha	35
4.3.2 Preparo de células Vero.....	35
4.4 Passagens do vírus semente em fibroblastos de embrião de galinha.....	36
4.5. Purificação de placas de lise do vírus semente.....	36
4.6. Síntese de DNA complementar, amplificação e seqüenciamento nucleotídico	37
4.7. Síntese de DNA complementar, amplificação e seqüenciamento nucleotídico dos vírus obtidos de placas de lise	40

4.8 Cultivo do vírus CAM-70 em fibroblastos de embrião de galinha para estudo do interferon	40
4.9 Titulação do interferon em fibroblastos de embrião de galinha	40
4.10 Titulação viral por contagem de placas de lise.....	42
4.11 Isolamento de RNA total de fibroblastos de embrião de galinha para estudo do interferon	43
4.12 Síntese de DNA complementar e amplificação dos genes ligados à via do interferon	43
4.13 Análise comparativa dos genomas de CAM-70 e de cepas vacinais de sarampo publicadas no GenBank	45
5. RESULTADOS	46
5.1 Seqüenciamento do vírus semente e das passagens.....	46
5.2 Seqüenciamento dos vírus obtidos da placas de lise	49
5.3 Análise comparativa dos genomas da cepa vacinal CAM-70 e os de outras vacinas de sarampo.....	51
5.3 Titulação do interferon em fibroblastos de embrião de galinha	58
5.4 Detecção da expressão do gene de 2-5 oligoadenilatosintetase (2-5 OAS) induzido por CAM-70 em fibroblastos de embrião de galinha	61
6. DISCUSSÃO	63
6.1 Estabilidade genômica do vírus do sarampo cepa vacinal CAM-70 ao longo de passagens em fibroblastos de embrião de galinha.....	63
6.2 Estudo de variantes virais através de seleção de placas de lise.....	64
6.3 Capacidade de indução de interferon em fibroblastos de embrião de galinha pelo vírus CAM-70 e sua sensibilidade ao interferon	65
6.4 Expressão de 2-5 OAS de <i>Gallus gallus</i> induzida por CAM-70.....	68
7. CONCLUSÕES	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXO I.....	86
ANEXO II	140

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Demonstração da queda da incidência global do sarampo em função do aumento da cobertura vacinal.....	4
Figura 1.2. Mapa ilustrando a cobertura vacinal global em crianças no ano de 2005.....	5
Figura 1.3. Incidência de sarampo no Brasil e estratégias de controle da doença de 1968- 2001	7
Figura 1.4. Casos de sarampo e cobertura vacinal entre crianças abaixo de 1 ano de idade no Brasil de 1976-2001	7
Figura 1.5. Histórico de atenuação de amostras vacinais	11
Figura 1.6. Histórico de passagem da cepa vacinal CAM-70	13
Figura 1.7. Representação esquemática do vírus do sarampo	16
Figura 1.8. Representação esquemática da membrana viral, organização genômica e ciclo de vida do vírus do sarampo.....	21
Figura 4.1. Análise dos 16 fragmentos obtidos por transcrição reversa seguida de amplificação por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) dos genomas virais de FMS-7, VSF3 e VSF-10	38
Figura 4.2. Esquema geral do genoma do vírus do sarampo CAM-70 e lista dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos fragmentos e para o seqüenciamento.	39
Figura 5.1. Cromatogramas mostrando as heterogeneidades nas posições 5180 e 5187 do genoma de FMS-7, VSF-3 e VSF-10.	48
Figura 5.2. Cromatograma mostrando a heterogeneidade na posição 1370 do genoma da amostra 9, coletada de placa de lise formada por FMS-7 em cultura de CEF.....	50
Figura 5.3. Esquema da árvore filogenética do genoma completo de cepas vacinais do vírus do sarampo.....	57
Figura 5.4 – Cinética de redução de efeito citopático do vírus Sindbis	59
Figura 5.5. Gráficos da cinética de produção de interferon e de replicação de CAM-70 em culturas de fibroblastos de embrião de galinha (CEF) ao longo de 10 ou 15 dias com diferentes multiplicidades de infecção (MOI).....	60
Figura 5.6 – Transcrição reversa seguida de amplificação por cadeia de polimerase (RT-PCR) para detecção da expressão de 2-5OAS em culturas de fibroblasto de embrião de galinha (CEF) infectadas com o vírus do sarampo cepa CAM-70 em cinética de replicação viral de 10 dias.....	62

ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.1. Estrutura taxonômica da família Paramyxoviridae com os vírus protótipos de cada gênero	15
Tabela 4.1. Desenho dos oligonucleotídeos para análise de expressão de interleucinas de <i>Gallus gallus</i>	44
Tabela 5.1. Alterações nucleotídicas e de aminoácidos entre seqüências de CAM-70.....	47
Tabela 5.2. Resultados da titulação viral e PCR dos vírus coletados das placas de lise	49
Tabela 5.3. Comparação dos genomas completos da cepa Edmonston selvagem e de cepas vacinais do vírus do sarampo.	53
Tabela 5.4. Comparação das cepas vacinais do vírus do sarampo em termos de substituição de nucleotídeos e de aminoácidos, em relação ao vírus Edmonston selvagem.....	56

ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
α	Alfa
β	Beta
ω	Ômega
γ	Gama
μ l	microlitro
2-5 OAS	2'-5' oligoadenilatosintetase
2-5A	2'-5' oligoadenilato
AD	Alta densidade
BD	Baixa densidade
Bio-Manguinhos	Instituto de tecnologia em imunobiológicos
CD46	Receptor para o vírus do sarampo
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	DNA complementar
CEF	Do inglês, "chicken embryo fibroblasts", fibroblastos de embrião de galinha
ChIFN	Do inglês, chicken interferon
CHO	Chinese hamster ovary, célula de linhagem de ovário de hamster chinês
CMC	carboximetilcelulose
CPE	Do inglês, cytopathic effect, efeito citopático
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>et al.</i>	e colaboradores
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GE	Do inglês, gene end, sinal de terminação
GP	Do inglês, gene promoter, promotor gênico
GS	Do inglês, gene start, sinal de iniciação
GSK	Glaxo-Smithkline
h	hora
IFN	Interferon
Jak	Do inglês, Janus tyrosine kinase
MeV	Do inglês, measles virus, vírus do sarampo
MIBE	Do inglês, measles inclusion body encephalitis
ml	mililitro
MMR	Measles Mumps Rubella, vacina tríplice viral sarampo, caxumba, rubéola
MOI	Do inglês, multiplicity of infection, multiplicidade de infecção
mRNA	RNA mensageiro
NCR	Do inglês, non-coding region, região não codificante
NK	Natural killer
pb	Pares de base
PBS	Do inglês, Phosphate buffered saline, tampão salina /fosfato

PCR	Do inglês, polymerase chain reaction, reação em cadeia da polimerase
PFU	Do inglês, plaque forming unit, unidades formadoras de placas
pi	Pós-infecção
POP	Procedimento operacional padronizado
RNA	Ácido ribonucleico
RNase L	Enzima que degrada RNA
RT	Do inglês, reverse transcripction, transcrição reversa
SLAM	Do inglês signalling lymphocytic activating molecule, receptor para o vírus do sarampo
SPF	Do inglês, specific pathogen free
STAT	Do inglês, signal transducer and activator of transcription
UNICEF	United Nations Children's Fund
v/v	Volume a volume
VSF	Vírus semente FIOCRUZ
WHO	World Health Organization, Organização Mundial de Saúde

1. INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação clínica do sarampo e epidemiologia

O sarampo é uma doença exantemática viral da infância, caracterizado por ser altamente contagioso. O homem é o único hospedeiro natural, embora macacos do velho mundo possam ser infectados experimentalmente (Rall, 2003). Antes da introdução da vacina contra o sarampo, até a idade de 18 anos, 95% a 98% dos indivíduos já tinha adquirido a infecção (Perry & Halsey, 2004). O sarampo é transmitido por via respiratória de pessoa a pessoa através da inalação de aerossóis ou por contato com secreções nasofaríngeas infectadas. A transmissibilidade é extremamente alta e estima-se que 90% das pessoas não-imunes expostas a um indivíduo infectado, adquirem a infecção. O vírus permanece ativo no ar ou sobre superfícies infectadas por até duas horas. O período de maior transmissibilidade é nos 3-4 dias que antecedem o aparecimento do exantema, entretanto há eliminação viral por até 4 dias após o aparecimento do exantema (Rall, 2003).

O período de incubação dura de 8 a 12 dias. O período prodrômico pode durar até 7 dias e começa com febre crescente, tosse, conjuntivite e fotofobia. Nesta fase surgem na cavidade oral, pontos branco-azulados denominados sinais de Koplik, que são patognomônicos do sarampo. 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. O exantema do sarampo caracteriza-se por uma erupção maculopapular que surge, inicialmente, na linha do cabelo e se distribui da cabeça para o tronco, tornando-se confluyente. O exantema dura de cinco a seis dias e desaparece na mesma ordem de seu aparecimento, da cabeça para as extremidades (Perry & Halsey, 2004; Moss & Griffin, 2006; WHO, 2007).

O sarampo é considerado uma doença branda a moderadamente grave. No sarampo benigno a recuperação clínica começa logo após o surgimento do exantema. Entretanto, aproximadamente 20% dos casos de sarampo desenvolvem uma ou mais complicações. O sarampo grave ocorre, particularmente, em crianças jovens, mal-nutridas, com dietas pobres em vitamina A e naquelas com o sistema imune enfraquecido. As complicações causadas pelo sarampo foram observadas em todos os órgãos e ocorrem devido à ruptura dos revestimentos epiteliais e à imunossupressão. O risco de complicações é mais elevado em crianças abaixo de 5 anos e adultos maiores de 20 anos e varia também em função do estado clínico do indivíduo (Perry & Halsey, 2004; WHO, 2007). A otite média é a complicação mais freqüente e ocorre

principalmente em crianças menores de 5 anos. A laringotraqueobronquite ou crupe viral acomete, especialmente, crianças abaixo de 2 anos. A pneumonia é a complicação mais grave e é responsável pela maioria dos óbitos associados com sarampo (Hussey & Clements, 1996). Ela pode ser causada pelo vírus do sarampo propriamente dito, por infecções secundárias virais com adenovírus ou vírus herpes simplex e por infecções secundárias bacterianas. A diarreia também constitui uma complicação grave com risco de desidratação. As convulsões febris são geralmente benignas e não deixam seqüelas (Perry & Halsey, 2004). A encefalomielite pós-infecciosa ocorre em 1-3 por 1000 indivíduos infectados e acomete, preferencialmente, adolescentes e adultos. Vinte e cinco por cento dos indivíduos atingidos vai a óbito e 33% dos sobreviventes tem seqüelas permanentes (Perry & Halsey, 2004). A panencefalite sub-aguda esclerosante (SSPE) é causada pela persistência do vírus no sistema nervoso central com manifestação dos sintomas de 9 meses a 30 anos após a infecção aguda (média de 8 anos). A prevalência desta complicação é de 1:10.000-300.000 casos e o curso, invariavelmente, fatal (Rima & Duprex, 2005). O sarampo em indivíduos imunocomprometidos pela infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida ou leucemia pode dar origem a uma infecção progressiva do sistema nervoso central denominada “measles inclusion body encephalitis” (MIBE), cujos sintomas surgem de 5 semanas a 6 meses após a infecção aguda e evoluem para óbito em 80% dos casos. A inflamação da córnea é comum no sarampo e geralmente evolui para a cura, entretanto, a deficiência de vitamina A, pode levar à lesão permanente da córnea e cegueira (Perry & Halsey, 2004).

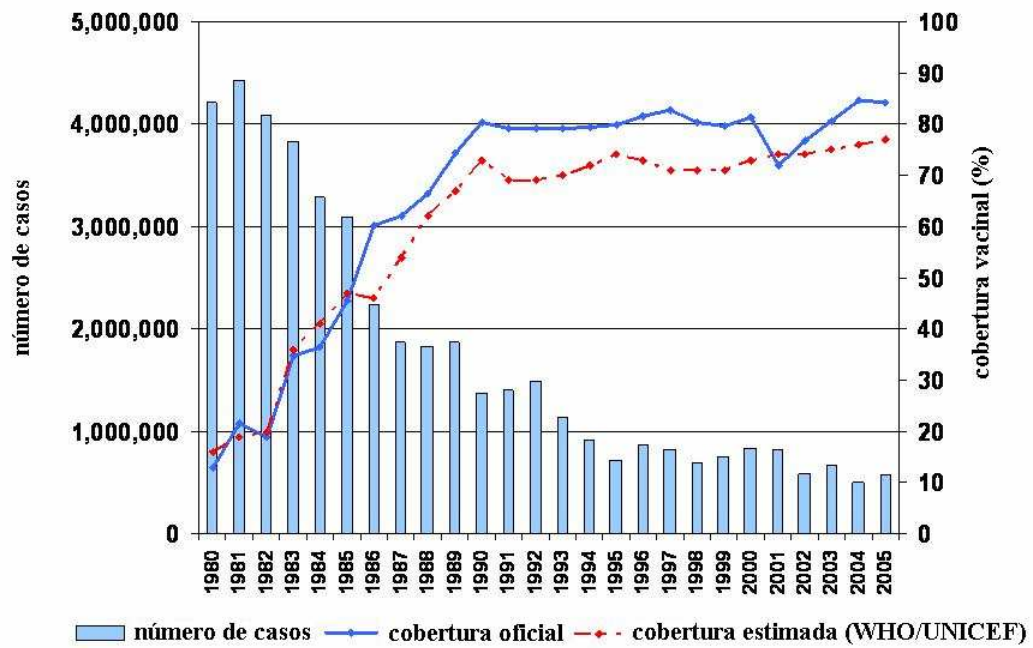
Antes do desenvolvimento e do uso difundido das vacinas contra o sarampo a estimativa anual de mortes causadas por esta doença era de 5-8 milhões por ano (Moss & Griffin, 2006). Em 2005, estima-se que ocorreram 345.000 óbitos por sarampo em todo o mundo (Figura 1.1). Embora, a incidência do sarampo tenha diminuído nos países industrializados, a doença continua a atingir diversos países em desenvolvimento. O vírus do sarampo possui características favoráveis à sua eliminação, como ter o homem como único hospedeiro, ser monotípico e facilmente diagnosticável após o aparecimento do exantema (Moss & Griffin, 2006). Entretanto, sua elevada infecciosidade exige uma alta cobertura vacinal (95%), o que não ocorre de modo homogêneo ao redor do mundo (WHO, 2007) (Figura 1.2). A WHO e a UNICEF estimaram que a média global de cobertura para imunização de rotina contra o sarampo aumentou de 71% para 77% entre 1999 e 2005. Em maio de 2005, estabeleceu-se a meta de reduzir a mortalidade por sarampo em 90% até o ano de 2010, em comparação com o ano 2000. Para atingir este objetivo a Measles Initiative, uma parceria da American Red Cross, United Nations Foundation (UN Foundation), United States Centers for Disease Control (CDC), WHO e UNICEF, estabeleceu as seguintes estratégias: 1)

Sólida rotina de imunização – a primeira dose de vacina contra o sarampo é administrada aos nove meses pelos serviços de imunização de rotina. Pelo menos 90% das crianças devem ser alcançadas por esta vacinação de rotina, a cada ano e em cada município; 2) Segunda oportunidade de vacinação – toda criança de nove meses a 15 anos que não recebeu a primeira dose tem uma segunda chance de receber a vacina. Esta estratégia evita o acúmulo de suscetíveis a níveis perigosos, pois atinge os indivíduos não vacinados que ainda não foram infectados. A segunda oportunidade de vacinação é fornecida pelos serviços de vacinação de rotina ou por atividades suplementares de imunização que visam vacinar todas as crianças, independente do histórico vacinal; 3) Vigilância – A coleta de sangue de casos suspeitos e a testagem em laboratórios certificados levam ao reconhecimento de surtos e permitem a adoção de medidas adequadas de resposta; 4) Manejo clínico de casos de sarampo – Inclui a suplementação com vitamina A e o tratamento de complicações com antibióticos, se necessário. Existem 47 países identificados como alvos para implementação de atividades aceleradas de redução de mortalidade por sarampo. Estes países são responsáveis por 95% das mortes globais por sarampo e incluem, na África: Angola, Benin, Burkina Faso, Burundi, Camarões, República Central Africana, Chad, Congo, Costa do Marfim, República Democrática do Congo, Eritréa, Guiné Equatorial, Etiópia, Gabão, Gana, Guiné, Guiné Bissau, Quênia, Libéria, Madagascar, Mali, Moçambique, Niger, Nigéria, Ruanda, Senegal, Serra Leoa, República Unida da Tanzânia, Togo, Uganda e Zâmbia. Na região do leste mediterrâneo: Afeganistão, Djibuti, Paquistão, Somália, Sudão e Iêmen; no sudeste da Ásia: Bangladesh, Índia, Indonésia, Myanmar, Nepal e Timor Leste; e na região oeste do Pacífico: Camboja, República Popular de Laos, Papua Nova Guiné e Vietnam (WHO, 2007).

O sarampo sub-clínico tem sido descrito em bebês com anticorpos maternos circulantes, em adultos com imunidade evanescente e em adultos com história de sarampo na infância (Muller, 2001). O papel destes indivíduos na transmissão do sarampo não é conhecido embora tenha sido sugerido por alguns autores (De Swart *et al.*, 2000). A infecção sub-clínica leva a crer que o vírus possa circular numa população de indivíduos supostamente protegidos, contribuindo assim para a epidemiologia do sarampo (Pedersen *et al.*, 1989).

Embora a erradicação do sarampo possa ser difícil de alcançar, com o uso disseminado da vacina, sua redução a níveis insignificantes pode ser atingida trazendo importantes conseqüências sociais e econômicas (Hilleman, 2002).

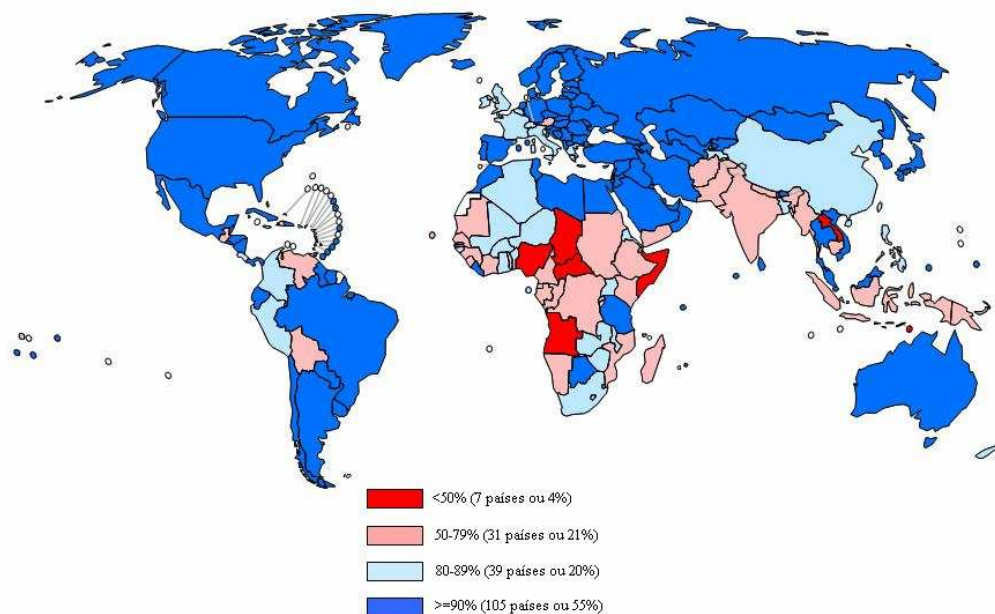
INCIDÊNCIA ANUAL GLOBAL DE SARAMPO E COBERTURA VACINAL 1980-2005



Fonte: WHO, 2006 modificado

Figura 1.1. Demonstração da queda da incidência global do sarampo em função do aumento da cobertura vacinal. Retirado do site: http://www.who.int/immunization_monitoring/big_measles_global_coverage.jpg

SARAMPO - COBERTURA VACINAL EM CRIANÇAS, 2005



Fonte: WHO/UNICEF, 2006

Figura 1.2. Mapa ilustrando a cobertura vacinal global em crianças no ano de 2005. Retirado do site: http://www.who.int/immunization_monitoring/big_measles_map_coverage.jpg

1.2 Epidemiologia do sarampo no Brasil

A vacina contra o sarampo começou a ser usada no Brasil no final dos anos 60, através da importação esporádica de vacinas disponíveis no mercado internacional. Em 1968, o sarampo passou a ser uma doença de notificação compulsória. Na década de 70 as epidemias chegaram a acometer 2-3 milhões de crianças. A partir da criação do Programa Nacional de Imunizações, em 1973, foram conduzidas campanhas de vacinação contra o sarampo e posteriormente, a vacinação em massa foi introduzida. O sucesso destas campanhas fez com que, em 1980 e 1981, o controle nacional do sarampo fosse intensificado visando áreas de baixa cobertura vacinal (Figura 1.3). 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 8 meses. Em 1976, a idade mínima mudou para 7 meses e em 1982, com base em um estudo de imunogenicidade, passou a ser de nove meses. 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. Nesta ocasião, foi implantado o Plano Nacional para a

Eliminação do Sarampo, que tinha como meta a eliminação da doença até o ano 2000. Em 1997, ocorreu a última grande epidemia, com cerca de 50.000 casos (Figura 1.4). Após a implantação da Força-tarefa para a Erradicação de Sarampo, em 1999, o número de casos autóctones caiu de 908 para zero, em 2001. Até o final do ano de 2006 o último surto registrado tinha ocorrido no Acre, com 15 casos (Prevots *et al.*, 2003). Nos últimos cinco anos, foram confirmados 10 casos da doença no País, todos importados ou como consequência de importação (Ministério da Saúde, 2007a). Entretanto, no dia 16/11/2006 o Ministério da Saúde foi notificado da confirmação laboratorial de dois casos de sarampo ocorridos no município de João Dourado, na Bahia. A partir de então, outros casos foram identificados nos municípios vizinhos de Irecê, Senhor do Bonfim e Filadélfia. Nos municípios atingidos e nas cidades vizinhas, por cerca de um mês e meio foi realizada extensa busca de casos, revisão de prontuários médicos, o bloqueio vacinal de todos os contatos, sensibilização de todos os serviços de saúde, exames sorológicos, isolamento viral, além de reavaliação de coberturas vacinais e ações de intensificação da vacinação de rotina. As investigações mostraram existir uma só cadeia de transmissão, porém não foi possível estabelecer como o sarampo chegou aos municípios. Foi identificado o genótipo D4, que tem circulação predominante na Europa e na África. O número de casos confirmados chegou a 47, e aparentemente, o surto foi controlado (Ministério da Saúde, 2007b).

A manutenção de coberturas vacinais altas e homogêneas na população infantil e a vacinação dos indivíduos adultos que pertencem aos grupos de risco (profissionais e estudantes das áreas de saúde e educação; trabalhadores de quartéis, pensões, centro de reclusão de menores, albergues, alojamentos, setor hoteleiro e de turismo, imigrantes e viajantes, rodoviárias, construção civil e profissionais do sexo; população flutuante de área de risco como caminhoneiros e cortadores de cana; trabalhadores que lidam com produtos hortifrutigranjeiros atuando em feiras livres e mercados) são essenciais para evitar a transmissão autóctone. A vacinação dos viajantes para países fora das Américas visa a impedir que pessoas não imunizadas previamente contraiam a doença fora do País e a reintroduzam em nosso meio (Secretária de Saúde, Estado do Ceará, 2007).

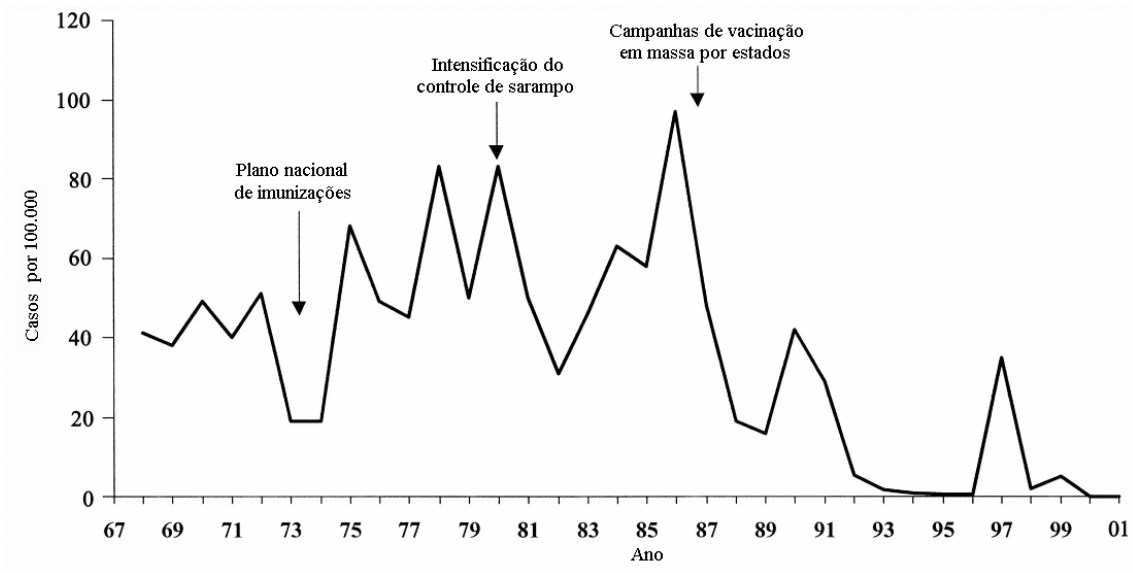


Figura 1.3. Incidência de sarampo no Brasil e estratégias de controle da doença de 1968- 2001 (adaptado de Prevots *et al.*, 2003).

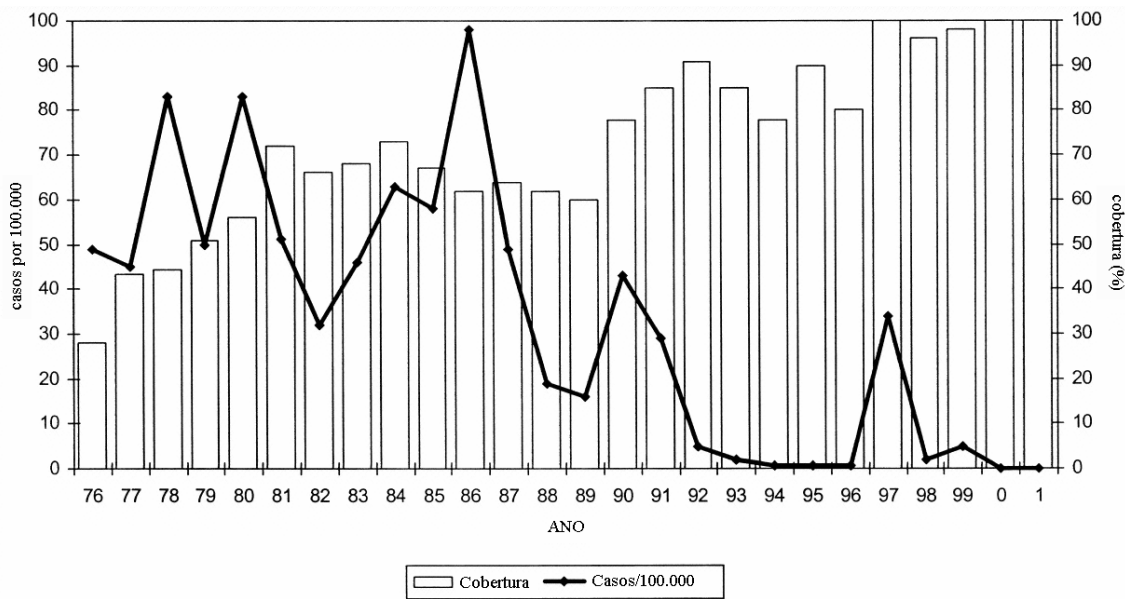


Figura 1.4. Casos de sarampo e cobertura vacinal entre crianças abaixo de 1 ano de idade no Brasil de 1976- 2001 (adaptado de Prevots *et al.*, 2003).

1.3 Vacinas

1.3.1 Origem e desenvolvimento

O isolamento do vírus do sarampo em cultura de tecidos foi obtido por Enders e Peebles, em 1954, e o desenvolvimento de uma vacina deu-se a seguir. A amostra Edmonston, batizada com o nome do paciente de quem o vírus foi isolado, foi utilizada para produzir a maior parte das vacinas existentes. Entretanto, outras vacinas de sarampo foram desenvolvidas na China, Rússia e Japão, utilizando isolados locais (Strebel *et al.*, 2004).

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).

1.3.2 Vacina inativada

Entre 1963 e 1967, também se utilizou uma vacina derivada do isolado Edmonston, inativada pelo formol ou por tween-éter (Feldman, 1962; Karzon *et al.*, 1962; Warren *et al.*, 1962; 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 o risco de produzir um sarampo atípico, mais grave do que a infecção natural, quando expostos 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. A inativação dos Paramyxovirus por formol e tween-éter provoca uma modificação na proteína F, explicando a resposta imune alterada dirigida para este tipo de vacina (Annuziato *et al.*, 1982; Merz *et al.*, 1980; Norrby, 1975; Norrby & Golmar, 1975; Norrby *et al.*, 1975).

1.3.3 Vacinas atenuadas

Diversas vacinas atenuadas contra o sarampo foram desenvolvidas no mundo e algumas estão em uso até os dias de hoje (Figura 1.5). 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 (Clements *et al.*, 1988; Hirayama, 1983; Makino, 1983; Okuno *et al.*, 1971; Peradze & Smorodintsev, 1983; Suzuki *et al.*, 1990). Recentemente, Parks

e cols. (2001) identificaram seqüências nucleotídicas idênticas para as cepas Moraten e Schwarz que apesar de serem, ambas, oriundas da cepa Edmonston, tiveram históricos de passagem distintos. 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).

A vacinação contra o sarampo foi uma das intervenções médicas de maior sucesso e melhor custo-benefício, já realizadas. A vacina tem um 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 (Pütz *et al.*, 2003; Moss & Griffin, 2006).

A vacina contra o sarampo induz tanto resposta imune humoral como celular. Embora seja muito eficaz em crianças e adultos, esta vacina é pouco imunogênica para crianças com idade inferior a 6-9 meses (Albrecht *et al.*, 1977; Markowitz *et al.*, 1990a; Strebel *et al.*, 2003). A eficiência reduzida ocorre devido à interferência de anticorpos maternos circulantes durante os primeiros meses de vida, que neutralizam o vírus vacinal (Albrecht *et al.*, 1977; Taylor *et al.* 1988; Osterhaus *et al.*, 1998). Além disso, a imaturidade imunológica da criança também é responsável por uma resposta imune inadequada, mesmo na ausência de anticorpos maternos (Gans *et al.*, 1998). O nível destes anticorpos é o fator determinante para o título de anticorpos da criança, bem como para a duração da proteção (Caceres *et al.*, 2000). A vacinação precoce reduz as taxas de soroconversão nas crianças que permanecem protegidas por anticorpos maternos. Em contrapartida, a vacinação tardia aumenta a taxa de soroconversão, mas deixa crianças com imunidade materna evanescente ou baixos níveis de anticorpos, sob o risco de adquirir a doença até serem vacinadas. Normalmente, as vacinas contra o sarampo contêm cerca de 10^3 a 10^4 partículas infecciosas por dose. Foi proposto e aprovado pela WHO (Markowitz *et al.*, 1990; WHO, 1988; Cutts *et al.*, 1995; WHO, 1990; Halsey, 1993) que crianças de determinados países da África recebessem, aos seis meses, vacinas de alto título, contendo $10^{4,7}$ a $10^{5,0}$ unidades por dose. Assumiu-se que, desta forma, seria possível vencer o obstáculo dos anticorpos maternos na elaboração da resposta imune. A vacina de alto título foi usada para vacinar crianças de 4-6 meses em diversos países, incluindo Senegal, Guiné Bissau, Haiti, Gâmbia, México e Peru. Estudos demográficos em longo prazo, de sobrevivência pós-vacinal revelaram mortalidade aumentada em crianças que receberam a vacina de alta dose em comparação com as que receberam a vacina comum ou nenhuma vacina. Isto ocorreu na Guiné Bissau e no Senegal, mas não na Gâmbia, México e Peru e durou por um período de até 7 anos (Halsey, 1993; Seng *et al.*, 1999). Os óbitos nos dois países foram predominantes em meninas e estavam relacionados a diferenças indefinidas

de gênero sexual. A razão para a alta mortalidade relacionada às vacinas de alto título não foi bem compreendida, mas ocorreu em países com elevada mortalidade infantil pelos parâmetros estatísticos e pode ter sido consequência da imunossupressão causada pelo vírus vacinal associada à alta mortalidade provocada por infecções oportunistas que acompanham o sarampo.

Mães vacinadas têm níveis de anticorpos inferiores aos das mães com história natural de sarampo (Brugha *et al.*, 1996). Desta forma, crianças nascidas de mães vacinadas adquirem menos anticorpos do que as nascidas de mães que tiveram sarampo (Krugman *et al.*, 1977; Yeager *et al.*, 1977; Lennon & Black, 1986; Maldonado *et al.*, 1995; Brugha *et al.*, 1996; Markowitz *et al.*, 1996) e são protegidos por menos tempo (Papania *et al.*, 1999). A duração dos anticorpos protetores após a vacinação contra o sarampo é mais variável e menos durável do que a adquirida através da infecção com sarampo selvagem. A queda dos anticorpos, entretanto, não implica necessariamente, na perda da imunidade protetora, uma vez que uma resposta imune secundária, normalmente, se desenvolve após a reexposição ao vírus (Moss & Griffin, 2006). Polimorfismos em genes de resposta imune como TAP2 e HLA-DQA1 também influenciam na resposta à vacina de sarampo (Ovsyannikova *et al.*, 2004).

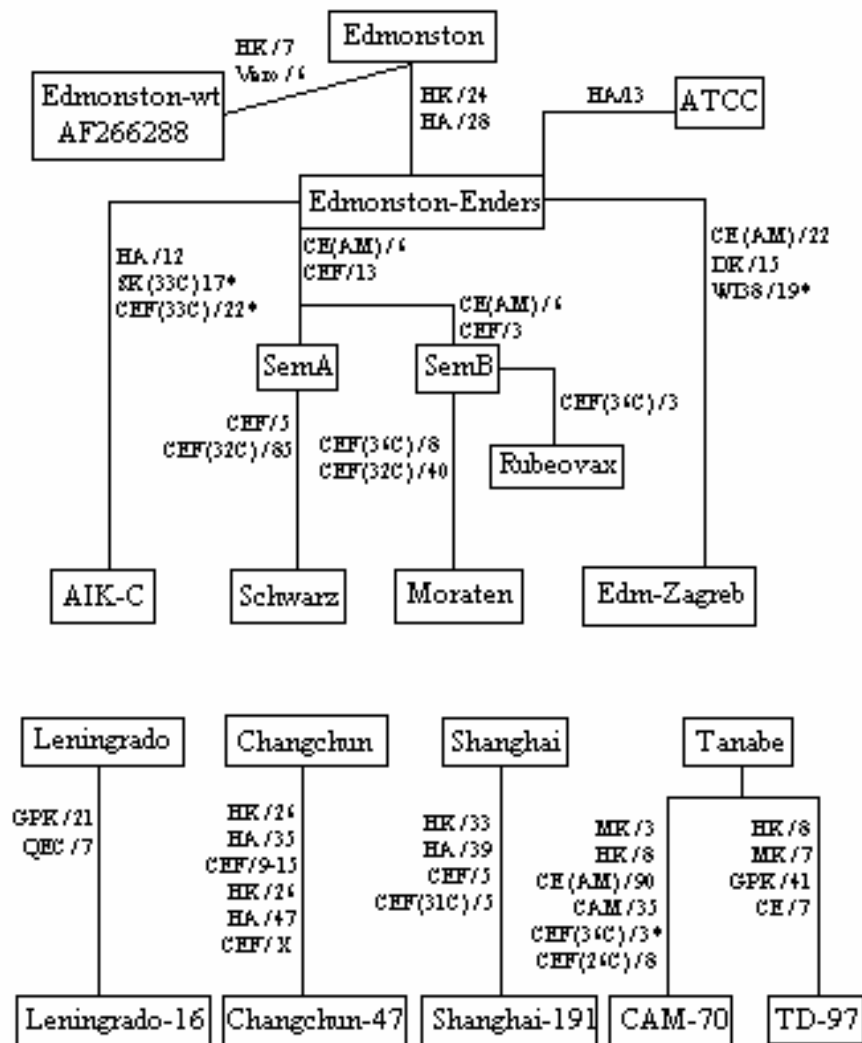


Figura 1.5. Histórico de atenuação de amostras vacinais. Culturas de células nas quais as amostras foram passadas no processo de atenuação: HK, rim humano; HA, cél. amniótica humana; CE (AM), cavidade intra-amniótica de embrião de galinha; CEF, fibroblasto de embrião de galinha; DK, rim de cão; WI-38, cél. diplóide humana; GPK, rim de cobaio; MK, rim de macaco; CAM, membrana corioalantóide de galinha; SK, rim de carneiro; QEC, cél. de embrião de codorna. Algarismo arábico = número de passagens nas respectivas culturas celulares. () = Temperatura de incubação das culturas infectadas. * = Amostra purificada por plaqueamento. AF266288, número de acesso ao GenBank para a cepa protótipo Edmonston-wt (adaptado de Rota *et al.*, 1994).

1.3.4 Limitações ao uso das vacinas atuais

A enorme contribuição das vacinas atenuadas de sarampo à saúde pública não invalida algumas limitações inerentes à sua utilização, que podem dificultar a erradicação da doença. As vacinas de vírus atenuado de sarampo são inativadas pela luz e pelo calor. Embora algum progresso tenha sido feito quanto à estabilidade das vacinas liofilizadas, elas ainda requerem a manutenção ininterrupta de uma cadeia de frio que dê suporte às atividades de imunização. A vacina contra o sarampo precisa ser injetada pela via subcutânea ou intramuscular requerendo profissionais de saúde treinados, agulhas, seringas e descartes

especiais para lixo biológico e perfurocortantes. De acordo com estimativas da WHO, até um terço das injeções aplicadas nos países em desenvolvimento não são seguras (WHO, UNICEF. State of the world's vaccines and immunization. Geneva. Switzerland, WHO/GPV/96.04, 1-159). A persistência de anticorpos maternos circulantes e a imaturidade imunológica reduzem a capacidade protetora da vacina comprometendo a eficácia da imunização em crianças pequenas (Gans *et al.*, 1998). Em indivíduos imunodeprimidos, a vacina atenuada contra o sarampo pode causar problemas graves como infecções cerebrais e pulmonares (Angel *et al.*, 1998; Colamaria *et al.*, 1989). Além da primeira dose de vacina, uma segunda oportunidade de vacinação deve ser oferecida para garantir a imunidade de grupo, propiciada pela alta cobertura vacinal e essencial para a interrupção da transmissão do vírus do sarampo.

A perda da confiança da população nas vacinas pode prejudicar, de modo significativo, os esforços de eliminação da doença. Isto foi demonstrado com os surtos de pólio no norte da Nigéria que se alastraram para diversos continentes após a perda de confiança da população local (Katz, 2006). Com o sarampo, isto ocorreu em comunidades que são contra a vacinação, por questões religiosas ou filosóficas (Feikin *et al.*, 2000). Ademais, um artigo publicado na revista *Lancet*, em 1998, foi incorretamente interpretado como sugerindo uma relação temporal entre o uso da vacina MMR e autismo e inflamação intestinal (Wakefield *et al.*, 1998). Esta publicação causou um grande impacto público, resultando na diminuição da cobertura vacinal em diversas regiões do Reino Unido e, conseqüentemente, no aumento da freqüência e do tamanho dos surtos de sarampo (Jansen *et al.* 2003). Estudos epidemiológicos e revisões subseqüentes rejeitaram a existência de uma relação causal entre autismo e inflamação intestinal com o uso de vacina MMR (Madsen *et al.*, 2002; DeStefano *et al.*, 2004). Em 2004, 10 dos 13 pesquisadores que participaram da publicação de 1998, afirmaram não terem demonstrado tal relação e, também seu apoio à utilização da vacina MMR (Murch, 2004).

1.3.5 Vacina CAM-70

A vacina de vírus atenuado contra o sarampo, cepa Biken CAM-70, passou a ser produzida em Bio-Manguinhos no início dos anos 80, após um acordo de transferência de tecnologia entre o Instituto Biken, do Japão, e a Fundação Oswaldo Cruz. Esta vacina foi desenvolvida por Okuno e cols. em 1970, a partir de material coletado da orofaringe de um paciente com sarampo benigno, isolado por M. Mutai em células primárias de rim de macaco *Cynomolgus*. Este isolado foi denominado Tanabe e através de passagens em células renais de macaco, células renais humanas e células de embrião de galinha, foi obtida a cepa vacinal

CAM-70 (Figura 1.6). Nos dias de hoje, esta vacina é usada principalmente no Japão. Seu uso no Brasil foi interrompido a partir de 2002, com a adoção da vacina tríplice viral para as campanhas de vacinação (Prevots *et al.*, 2003). Embora seja considerada por alguns autores como mais atenuada que outras cepas vacinais (Berry *et al.*, 1992), a imunogenicidade da vacina CAM-70 é equivalente à das vacinas Schwarz e Moraten (Camacho *et al.*, 2000). No Brasil, o uso da vacina CAM-70 na vacinação de rotina foi uma importante contribuição para a contenção da transmissão viral e para a eliminação do sarampo autóctone no Brasil, cujo último caso havia sido registrado em 2000, até o surgimento surto do final de 2006, na Bahia.

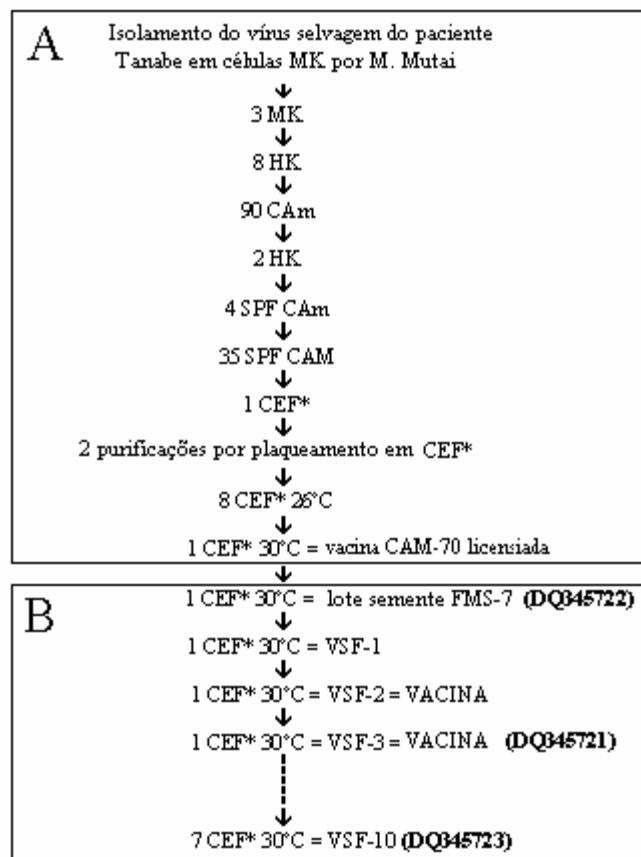


Figura 1.6. Histórico de passagem da cepa vacinal CAM-70. (A) histórico de atenuação da vacina (B) passagens para produção de vacina em Bio-Manguinhos e avaliação da estabilidade genética. Temperatura de incubação considerada como 37°C exceto quando indicado. Os números se referem às passagens em cada tipo celular. MK, rim de macaco; HK, rim humano; CAM, membrana amniótica de embrião; CAM, membrana corioalantóide; SPF, livre de patógenos específicos; *, SPF; CEF, fibroblastos de embrião de galinha. As letras em negrito indicam os números de acesso ao GenBank.

1.3.6 Perspectivas para novas vacinas

A vacina ideal contra o sarampo deve ser de baixo custo, segura, termoestável, imunogênica para neonatos e crianças jovens e administrada em dose única sem o uso de agulhas ou seringas. A idade de vacinação deve coincidir com as vacinas do *Expanded Program on Immunization* (EPI) para alcançar o cumprimento máximo e partilhar recursos. Finalmente, uma nova vacina não deve colocar seus usuários sob risco de sarampo atípico quando expostos ao vírus selvagem (uma complicação da vacina inativada) e não deve estar associada à imunossupressão prolongada, afetando a resposta imune a infecções subseqüentes (uma complicação da vacina de alto título) (Moss & Griffin, 2006).

A administração das vacinas de sarampo em seres humanos por vias alternativas foi revisada por Cutts e cols. (1997). A inalação de vacina líquida nebulizada é uma das abordagens mais promissoras na imunização contra o sarampo. A administração de vacina por aerossol tem o potencial de facilitar a vacinação contra o sarampo em campanhas de vacinação em massa e a WHO planeja licenciar uma vacina de sarampo na forma de aerossol até o ano de 2009 (Moss & Griffin, 2006).

A administração de vacinas de sarampo por aerossol demonstrou ser altamente eficiente como reforço em crianças previamente imunizadas com vacina de sarampo, embora a resposta primária a estas vacinas seja inferior às elicitadas pelas vacinas administradas pela via sub-cutânea (Dilraj *et al.*, 2000; Bennett *et al.*, 2002; Wong-Chew *et al.*, 2004). A resposta imune à administração intranasal de vacina de sarampo pode ser melhorada com o uso de adjuvantes (Chabot *et al.*, 2005).

Diversas vacinas vêm sendo desenvolvidas e testadas. Vacinas de “DNA nu” (naked DNA) são termoestáveis, baratas e, teoricamente, podem eliciar respostas de anticorpos mesmo na presença de anticorpos maternos circulantes. Vacinas de DNA que codificam para a proteína H, proteína F ou ambas são seguras, imunogênicas e protegem contra o desafio com sarampo em macacos Rhesus jovens e suscetíveis (Polack *et al.*, 2000). Outra vacina de DNA contendo os genes H, F e N e um adjuvante molecular IL-2 forneceu proteção a macacos jovens na presença de anticorpos neutralizantes (Premenko-Lanier *et al.*, 2004; Premenko-Lanier *et al.*, 2005). Vetores alternativos para administração de genes do vírus do sarampo como alfavírus (Pan *et al.*, 2005), vírus da parainfluenza (Skiadopoulos *et al.*, 2001) e bactérias entéricas (Pasetti *et al.*, 2003) têm sido pesquisados. Novas estratégias de imunização oral utilizando a expressão da proteína H em plantas vêm sendo desenvolvidas (Webster *et al.*, 2005).

1.4 Agente infeccioso

O vírus do sarampo é considerado um vírus respiratório, da família *Paramyxoviridae*, sub-família *Paramyxovirinae*, gênero *Morbillivirus*. Dentre os integrantes de seu gênero, é o único que afeta seres humanos, embora também possa infectar, experimentalmente, primatas (Griffin, 2001) (Quadro 1.1).

Quadro 1.1. Estrutura taxonômica da família *Paramyxoviridae* com os vírus protótipos de cada gênero. Dentro dos *Morbillivirus*, todos os membros do gênero estão representados.

Família	<i>Paramyxoviridae</i>
Sub-família	<i>Paramyxovirinae</i>
Gênero	<i>Respirovirus</i>
Vírus	Vírus Sendai (SeV)
Gênero	<i>Rubulavirus</i>
Vírus	Vírus da caxumba (MuV)
Gênero	<i>Morbillivirus</i>
Vírus	Vírus do sarampo (MeV) Vírus da cinomose canina (CDV) Morbillivirus de golfinho (CEMV) Vírus da peste-des-petits-ruminants (PPRV) Vírus da cinomose das focas (PDV) Vírus Rinderpest (RPV)
Sub-família	<i>Pneumovirinae</i>
Gênero	<i>Pneumovirus</i>
Vírus	Vírus sincicial respiratório (HRSV)
Gênero	<i>Metapneumovirus</i>
Vírus	Vírus da rinotraqueíte de peru (TRTV)

O vírus do sarampo tem partículas de cerca de 150nm de diâmetro, normalmente, esféricas, pleomórficas, envelopadas, embora também possam ser encontradas partículas filamentosas. Um envelope lipídico, derivado da membrana plasmática, recobre o nucleocapsídeo e possui duas glicoproteínas transmembranas: a hemaglutinina (H) e a proteína de fusão (F) (Figura 1.7). Ambas possuem uma porção projetada para o exterior do

envelope medindo de 9-15 nm. Associada à parte interna do envelope, encontra-se a proteína de matriz (M). O nucleocapsídeo composto pela nucleoproteína (N) viral associada ao genoma de RNA, possui simetria helicoidal, 21 nm de diâmetro, um orifício central de 5 nm e um passo de 6 nm. As proteínas L e P formam o complexo transcricional e encontram-se associadas com o RNA.

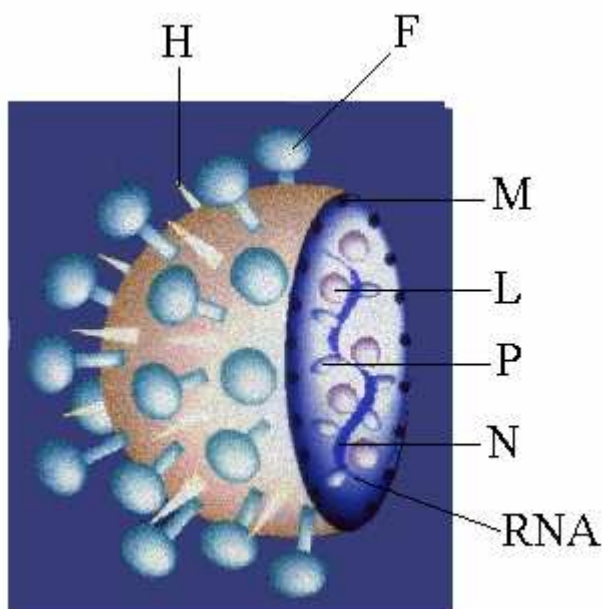


Figura 1.7. Representação esquemática do vírus do sarampo. As glicoproteínas H e F estão ancoradas no envelope. A proteína M está associada com a porção interna do envelope. O nucleocapsídeo é composto pela nucleoproteína associada ao genoma de RNA, além das proteínas L e P que constituem o complexo transcricional (adaptado de <http://www.tau.ac.il/lifesci/departments/biotech/members/rozenblatt/figures.html>, capturado em 26/10/2007).

1.5 Organização genômica e proteínas

O genoma do vírus do sarampo é composto por um RNA não segmentado, de fita simples e polaridade negativa com 15.894 nucleotídeos (Figura 1.8A). A extremidade 3' do genoma contém uma região não-codificante (NCR) de 107 nucleotídeos denominada promotor genômico (GP) que inclui uma seqüência líder de 52 nucleotídeos, o sinal de iniciação (GS) para a transcrição do mRNA do gene N e o motivo B-box que regula a transcrição e a replicação do vírus. Os primeiros nucleotídeos da extremidade 3' são reconhecidos pelo complexo polimerase para iniciação da síntese de mRNAs individuais ou RNA antígeno (Liu *et al.*, 2006). A partir da 3'NCR, seguem-se seis genes não-sobrepostos que codificam para seis proteínas estruturais e duas proteínas não-estruturais adicionais codificadas pelo gene P, na seguinte ordem: N (nucleocapsídeo), P (fosfoproteína)/C/V, M (proteína de matriz), F (proteína de fusão), H (hemaglutinina), L (polimerase) (Figura 1.8A). Cada unidade transcricional é separada por uma região

intergênica 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 onde o trinucleotídeo é GCA (Figura 1.8A). No final do genoma, encontra-se uma região não-codificante de 109 nucleotídeos denominada promotor anti-genômico. Esta região é responsável pela iniciação da síntese do genoma negativo e inclui os 37 nucleotídeos trailer, os motivos (GN₅)₃ e B'-box e o sinal para terminação (GE) do gene L (Crowley *et al.*, 1988; Sidhu *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2006). Os genomas dos *Morbillivirus* são únicos entre os *Paramyxovirus* por conterem uma região não-codificante muito longa, com cerca de 1.000 nucleotídeos, entre as unidades abertas de leitura dos genes M e F. Esta região é rica em GC e se dobra em estruturas secundárias (Takeda *et al.*, 2005), que, provavelmente, regulam a tradução e localização dos mRNAs (Liermann *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1987).

O RNA livre não é infeccioso. O RNA viral 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 transcrição, replicação e empacotamento da progênie viral (Horikami & Moyer, 1995; Sedlmeier & Neubert, 1998). Tanto a proteína N como a proteína P são fosforiladas (Bellini *et al.*, 1994).

O gene P codifica para três produtos gênicos. Dois deles, a proteína P e a proteína C, são codificadas 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 à 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 (Schaffer *et al.*, 2003, Yokota *et al.*, 2003). Outra função descrita é a regulação da síntese de RNA (Reutter *et al.*, 2001). A proteína 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; Devaux *et al.*, 2006; Witko *et al.*, 2006).

O produto do gene M é uma proteína básica de 335 aminoácidos com diversas regiões hidrofóbicas conservadas. Nas células infectadas a proteína M está associada com o revestimento interno da membrana plasmática e com os nucleocapsídeos (Hirano *et al.*, 1992). A proteína M dirige a montagem viral e é responsável pelo brotamento do vírus (Lamb & Kolakofsky, 2001; Rima & Duprex, 2006).

A proteína F constitui uma das duas glicoproteínas da superfície viral. 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 formada 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 dissulfeto (Figura 1.8B) (Maisner *et al.*, 2000). A glicosilação é fundamental para o processamento proteolítico e o transporte de F (Sato *et al.*, 1988). A subunidade F₂ possui todos os sítios de glicosilação (Alkhatib *et al.*, 1994). As glicoproteínas F e H interagem entre si para formar o complexo de fusão biologicamente 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).

A proteína H é a proteína de ligação ao receptor celular e também responsável pela hemaglutinação (Varsanyi *et al.*, 1984). A proteína H aglutina somente hemácias de macaco, em especial, hemácias de macaco verde africano (Peries & Chany, 1962). Ela é uma glicoproteína transmembranosa que se localiza na superfície das células infectadas ou dos virions, como homodímeros ligados por pontes dissulfeto (Alkhatib & Briedis, 1986). A proteína H recebe cadeias oligossacarídicas ligadas à asparagina no retículo endoplasmático rugoso. A adição de açúcares adicionais ocorre no complexo de Golgi (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).

A proteína L ou polimerase viral é a proteína viral menos abundante na célula infectada e está associada ao nucleocapsídeo viral. A proteína L é a maior proteína viral (2183 aa) e assume-se que contenha todas as atividades enzimáticas necessárias para a transcrição e replicação (Bankamp *et al.*, 2002).

1.6 Replicação viral

A infecção natural se inicia quando o vírus do sarampo atinge as células epiteliais do trato respiratório de indivíduos suscetíveis. O vírus se multiplica localmente e se espalha para

tecidos linfáticos adjacentes. A replicação nos linfonodos locais é seguida pela viremia e disseminação do vírus para a maior parte dos órgãos, incluindo linfonodos, pele, rins, trato gastrointestinal e fígado, onde o vírus replica em células epiteliais e endoteliais e em linfócitos, monócitos e macrófagos (Moss & Griffin, 2006).

Em 1993, a proteína CD46 de células humanas ou co-fator de proteína de membrana foi identificada como um receptor celular para cepas vacinais do vírus do sarampo (Figura 1.8C) (Dörig *et al.*, 1993; Naniche *et al.*, 1993). Esta molécula é uma glicoproteína transmembranar que pertence à família dos reguladores da ativação do complemento e é amplamente expressa em todas as células nucleadas humanas (Liszewski *et al.*, 1991). A CD46 está ausente nas hemácias, entretanto, uma proteína homóloga foi identificada em eritrócitos de macaco (Nickells & Atkinson, 1990) explicando o fato do vírus do sarampo aglutinar hemácias de macaco, mas não ser capaz de aglutinar hemácias humanas (Norrby, 1962; Peries & Chany, 1962). Diversos estudos forneceram evidências de que a proteína H de cepas derivadas da Edmonston interagem com CD46, o que não ocorre com vírus selvagens isolados em células B95a (Lecouturier *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1998). Recentemente, Tahara e colaboradores (2007) demonstraram que mutações sítio dirigidas que levam a substituições de aminoácidos na proteína H de vírus selvagens os habilitam a usar eficientemente CD46 como receptor.

A proteína CD150 ou SLAM (signalling lymphocytic activating molecule) foi identificada como sendo um receptor celular comum para cepas vacinais, bem como para isolados selvagens do vírus do sarampo (Tatsuo *et al.*, 2000). O CD150 é expresso em timócitos imaturos, células T de memória, células B, macrófagos e células dendríticas maduras. Após a estimulação com antígenos ou mitógenos, todas as células T e B expressam SLAM (Aversa *et al.*, 1997b; Cocks *et al.*, 1995; Sidorenko & Clark, 1993). Em seres humanos, monócitos CD14⁺ das amídalas e do baço expressam SLAM (Farina *et al.*, 2004). De acordo com a literatura, não existe nenhuma cepa de vírus do sarampo que não utilize SLAM como receptor. Em geral, vírus isolados em células B95a utilizam SLAM, mas não CD46 como receptor, enquanto que cepas da linhagem Edmonston ou cepas isoladas em células Vero utilizam tanto SLAM como CD46. Na verdade, o resultado de estudos usando células Vero expressando SLAM e CHO expressando SLAM ou CD46 leva a crer que o uso de CD46 como receptor é resultante de adaptação *in vitro* e não reflete uma propriedade do vírus do sarampo *in vivo* (Manchester *et al.*, 2000; Tatsuo *et al.*, 2000; Ono *et al.*, 2001, Yanagi *et al.*, 2006). Estudos com vírus do sarampo recombinantes expressando GFP (green fluorescent protein) demonstraram a entrada na célula independente de SLAM e CD46 (Hashimoto *et al.*, 2002). Andres e colaboradores (2003) reportaram a infecção de células

endoteliais com vírus selvagem de sarampo por uma via independente de CD46 e SLAM. O vírus do sarampo causa infecção persistente em células neurais de pacientes com SSPE, apesar de não ter sido detectada a expressão de SLAM nestas células (Cocks *et al.*, 1995; Aversa *et al.*, 1997a). Estes dados sugerem a existência de um ou mais receptores alternativos desconhecidos envolvidos na entrada de diversas cepas de vírus do sarampo a tipos celulares distintos.

A ligação do vírus ao receptor celular é feita através da 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 (Figura 1.8D). O nucleocapsídeo serve como molde para transcrição primária dos mRNAs assim como para replicação do genoma de fita negativa. A RNA polimerase viral se liga às seqüências 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. A seqüência intergênica (3'-GAA-5') não é transcrita e a transcrição é reiniciada no gene seguinte. Estes eventos de iniciação e terminação são repetidos no final dos genes N, P, M, F, H e L. A freqüência 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 (Figura 1.8D) (Rima & Duprex, 2005).

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 são sintetizadas no retículo endoplasmático e passam por uma maturação conformacional antes de serem transportadas pela via secretória. Os nucleocapsídeos são transportados para a membrana celular, onde se associam com a proteína M e as glicoproteínas em estruturas denominadas *rafts*, de onde brotam para formar novas partículas virais (Vincent *et al.*, 2000).

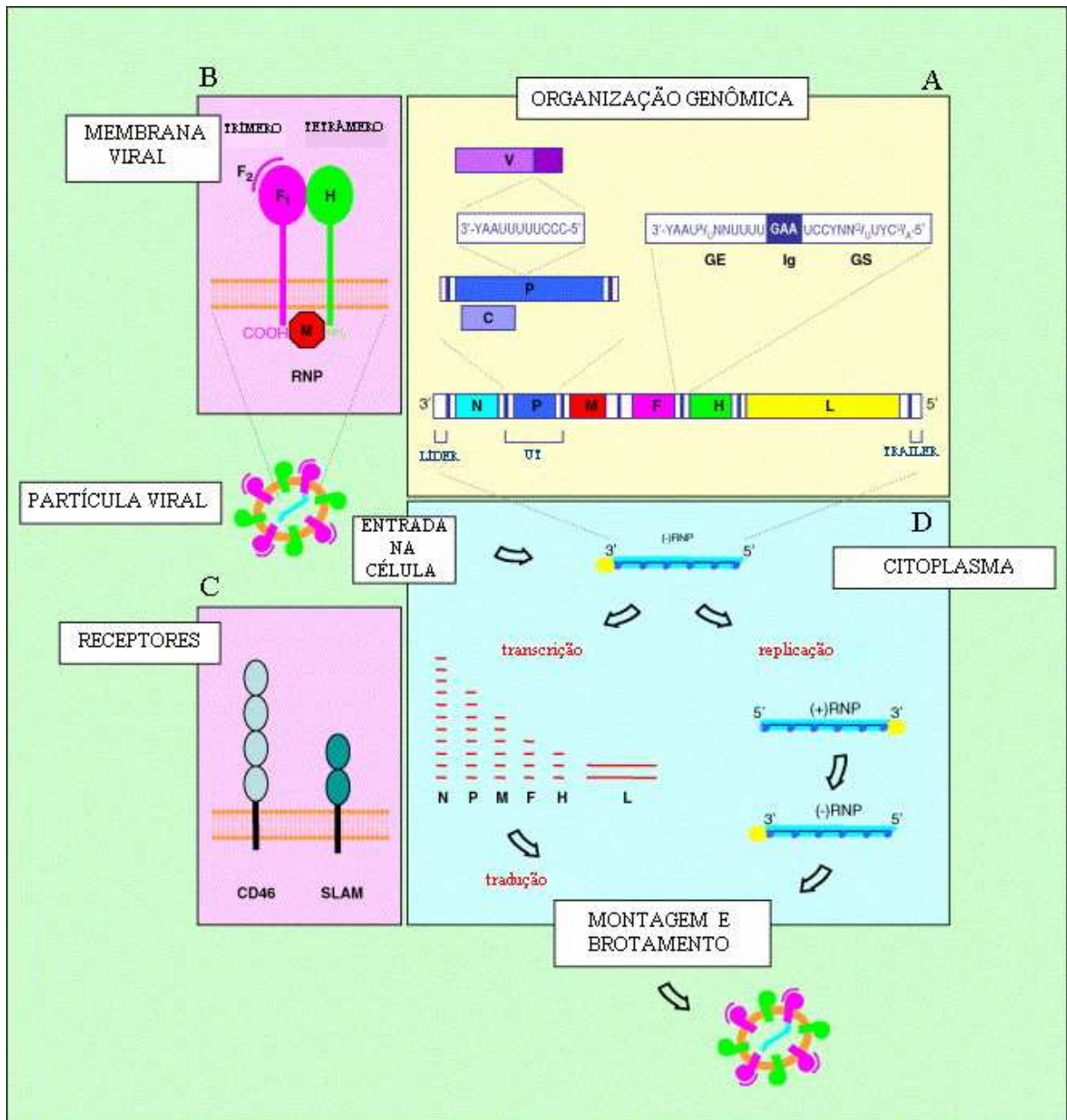


Figura 1.8. Representação esquemática da membrana viral, organização genômica e ciclo de vida do vírus do sarampo. **A.** Esquema do genoma viral de 15894 nucleotídeos. Cada gene codifica para uma única proteína com exceção do gene P que codifica, adicionalmente, para as proteínas C e V. As unidades transcripcionais (UT), RNAs mensageiros e proteínas não estão em escala. GE = terminação gênica, GS = início do gene, Ig = região intergênica. **B.** A bi-camada lipídica do envelope é derivada da membrana celular e possui projeções formadas pelas duas glicoproteínas virais, a proteína de fusão (F) e a hemaglutinina (H). **C.** Receptores celulares, aos quais ocorre a ligação do vírus através das glicoproteínas virais. **D.** Esquema da replicação viral.

1.7 Genótipos

Embora o vírus do sarampo seja considerado, do ponto de vista sorológico, como um vírus monotípico, existem variações genéticas e antigênicas nas cepas selvagens (Taylor *et al.*, 1991; Tamin *et al.*, 1994). A caracterização genética dos vírus do sarampo identificou oito clades (A-H) divididas em 22 genótipos estabelecidos e um genótipo proposto. As clades B, C, D, G e H possuem, individualmente, múltiplos genótipos (B1-3, C1-2, D1-10, G1-3, H1-2). As clades A, E e F, no entanto, possuem apenas, um genótipo cada e neste caso, a designação do genótipo é a mesma da clade. (WHO, 2001; Rota & Bellini, 2003). As seqüências nucleotídicas das cepas vacinais indicam que todas elas pertencem ao genótipo A, independente da origem do isolado do qual elas derivaram. Apesar destas vacinas terem sido originadas a partir de passagens em diferentes sistemas celulares e temperaturas de incubação variadas, diferenças genéticas de menos de 0,6% entre a maior parte delas são demonstradas através de seqüenciamento nucleotídico, agrupando todas as cepas vacinais dentro do genótipo A (Rota *et al.*, 1994). Este fato pode sugerir uma ampla distribuição do genótipo A na era pré-vacina, bem como uma facilidade no isolamento destes vírus. Vírus pertencentes ao genótipo A vêm sendo isolados nos últimos 10 anos, e embora seja possível que este genótipo continue a circular até os dias de hoje, existe uma grande possibilidade de que estes isolados recentes sejam vírus vacinais ou contaminantes de laboratório (Rota *et al.*, 2003). Esforços no sentido de identificar marcadores genéticos que permitam distinguir isolados selvagens e vírus vacinais pertencentes ao genótipo A vêm sendo realizados (Rota *et al.*, 1994; Rota & Bellini, 2003). Todos os genótipos do vírus do sarampo podem ser neutralizados, *in vitro*, por soro de indivíduos vacinados, embora isto ocorra com eficiência variável (Tamin *et al.*, 1994; Klingele *et al.*, 2000). Não existem diferenças biológicas conhecidas entre vírus pertencentes a genótipos distintos. Ademais, não existe associação entre genótipos e gravidade da doença, desenvolvimento de seqüelas ou variação na sensibilidade do diagnóstico laboratorial (Riddell *et al.*, 2005).

Até 1998, não havia a padronização de uma nomenclatura e de um protocolo de análise para descrever as características genéticas dos vírus selvagens. Em maio do referido ano, a WHO recomendou a adoção de uma nomenclatura padronizada para denominação das cepas virais e de um protocolo de análise das amostras que permitisse que as seqüências nucleotídicas pudessem ser comparadas entre laboratórios distintos, recomendações estas que foram atualizadas em 2001 e 2003. A WHO determinou que os 450 nucleotídeos que codificam para os 150 aminoácidos da porção COOH-terminal do gene N fossem a

quantidade mínima de seqüência necessária para genotipar um isolado ou material clínico de sarampo (WHO, 1998; WHO, 2001; WHO, 2003). Nesta região, que é uma das mais variáveis do genoma, a variabilidade entre amostras selvagens pode chegar a 12% (WHO, 1998). Seqüências completas do gene H devem ser obtidas de cepas representantes ou em caso de suspeita do surgimento de um novo genótipo. O gene H possui até 8% de variabilidade entre diferentes cepas. Novos genótipos são aceitos se a seqüência nucleotídica em questão diferir da seqüência de referência mais próxima em mais de 2,5% no gene N e em mais de 2% no gene H (WHO, 2001).

A análise da variabilidade genética entre seqüências nucleotídicas de isolados selvagens do vírus do sarampo constitui uma ferramenta essencial para a vigilância do sarampo. A caracterização molecular de isolados virais vem sendo usada com sucesso para determinar a relação epidemiológica entre os casos e a origem geográfica de vírus importados (Mulders *et al.*, 2001). Cerca de 5% dos indivíduos vacinados, apresentam sintomas brandos após a vacinação contra o sarampo e alguns desses casos poderia ser erroneamente interpretado como sarampo selvagem (Strebel *et al.*, 2003). A caracterização genética dos isolados virais permite distinguir entre casos associados à vacina e infecção selvagem (Rota *et al.*, 1995; Rota *et al.*, 2002).

1.8 Interferon

Os interferons (IFNs) constituem uma superfamília de proteínas multifuncionais envolvidas na defesa contra infecções virais, regulação do crescimento celular e ativação do sistema imune. Existem dois principais tipos de IFN classificados: os IFNs do tipo I, também denominados IFNs virais, que incluem o IFN- α (leucócitos), o IFN- β (fibroblastos) e o IFN- ω e o IFN do tipo II, denominado IFN imune ou IFN- γ . Os IFNs do tipo I são induzidos em resposta à infecção viral e o IFN do tipo II é sintetizado em resposta ao reconhecimento de células infectadas por linfócitos T ativados e células NK (Goodbourn *et al.*, 2000). As células só sintetizam IFN quando ativadas por um agente indutor. De modo geral, a infecção viral é o agente biológico indutor de IFN mais comum, entretanto, protozoários, micoplasmas, bactérias e alguns de seus constituintes também podem induzir a síntese de IFN em determinados tipos celulares. A indução viral da síntese de IFN é mediada por RNA de dupla fita (ds-RNA) fornecidos pelo genoma viral, propriamente dito, ou resultante da replicação ou transcrição de genomas virais (Vilcek *et al.*, 1996). A atividade do IFN é iniciada através da ligação do IFN α/β a receptores espécie-específicos na superfície celular resultando na

ativação das vias de sinalização Jak/STAT (Jak do inglês “Janus tyrosine kinase”; STAT do inglês “signal transducer and activator of transcription”) (Samuel, 2001). O resultado desta sinalização é a ativação da transcrição de genes alvo. As proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição da família STAT são fosforiladas nos resíduos de tirosina pelas tirosinas quinases da família Janus. Proteínas Jak associadas à porção citoplasmática do receptor transmembranar são ativadas após a ligação dos IFNs ao receptor, fosforilando a proteína STAT. STAT é, então, translocada para o núcleo onde se liga a promotores dos genes induzidos pelo IFN, iniciando a transcrição destes. Os componentes da resposta antiviral induzidos pelo IFN mais estudados até hoje são a proteína quinase PKR e a 2'-5' oligoadenilato sintetase (2-5 OAS), embora outros fatores também possam estar envolvidos (Goodbourn *et al.*, 2000; Samuel, 2001). Os produtos dos genes induzidos por IFN α/β tornam as células resistentes à infecção viral através de mecanismos como clivagem do mRNA, inibição da tradução viral e inibição do crescimento celular (Goodbourn *et al.*, 2000). A presença de RNAs de dupla fita no citoplasma celular é necessária para a ativação da enzima 2-5 OAS. Esta enzima catalisa a síntese de oligoadenilatos denominados 2-5A devido a suas ligações fosfodiéster 2'-5'. Os oligoadenilatos ativam a enzima RNase L que cliva RNAs de fita dupla. Para replicar de maneira eficiente, diversos vírus desenvolveram estratégias para superar os mecanismos de defesa antiviral do hospedeiro (Goodbourn *et al.*, 2000; Gotoh *et al.*, 2002; Katze *et al.*, 2002). As ofensivas virais contra a resposta de IFN foram classificadas em três tipos: 1) alguns vírus têm a habilidade de bloquear a indução do IFN α/β , 2) outros inibem a transdução de sinal em resposta ao IFN α/β atingindo as moléculas envolvidas na via de sinalização Jak/STAT, 3) outros podem inibir as enzimas anti-virais induzidas pelo IFN. Alguns vírus, ainda, adotam múltiplas ofensivas.

Naniche e cols (2000) demonstraram que cepas atenuadas do vírus do sarampo induzem significativamente mais IFN α/β do que isolados selvagens. Foi sugerido que as proteínas não-estruturais V e C do vírus do sarampo interferem com as vias de sinalização de IFN α/β . A proteína V inibe a fosforilação de STAT1 e STAT2 (Takeuchi *et al.*, 2003) e Jak1 (Yokota *et al.*, 2003) e impede a translocação nuclear de STAT1 induzida por IFN seja por seqüestro ou inibição da fosforilação (Caignard *et al.*, 2007). Os aminoácidos tirosina 110 e cisteína 272 da proteína V foram identificados como requisitos para a inibição da sinalização de IFN α/β (Ohno *et al.*, 2004). A deficiência na indução da atividade de 2-5A foi observada em células K-562 (células de leucemia mielóide crônica) infectadas com diversas cepas do vírus do sarampo, inclusive com CAM-70. A baixa atividade de 2-5A nestas células foi atribuída à supressão na tradução ou transcrição de mRNA de 2-5 OAS (Fujii *et al.*, 1988, 1990).

2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Em agosto de 1980, foi estabelecido um acordo de cooperação técnica entre o Brasil e o Japão para produção da vacina contra o sarampo utilizando a cepa Biken CAM-70 em Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz. No Brasil, a CAM-70 foi amplamente empregada no Programa Nacional de Imunizações-PNI a partir do início de sua produção em Bio-Manguinhos, em 1982, até o final de 2002, quando passou a ser substituída gradativamente pela vacina tríplice viral. A vacina de sarampo monovalente com cepa CAM-70 vem sendo utilizada no Japão desde o princípio dos anos 80 até os dias de hoje.

Apesar de, atualmente, a vacina monovalente contra o sarampo não estar sendo produzida em Bio-Manguinhos, a capacidade de produção permanece instalada visando possíveis transferências de tecnologia, atendimento de potenciais demandas externas e a competência para o desenvolvimento de uma vacina triviral com o componente sarampo CAM-70 para atender mercados limitados pelo contrato de transferência de tecnologia assinado com a GSK para a produção de triviral.

O estudo das características genômicas e biológicas do vírus CAM-70 e da sua estabilidade do ponto de vista genético são de extrema importância no controle de qualidade da vacina, no preparo de novos lotes semente e no domínio da informação sobre o produto na resposta a reações adversas ou falhas na resposta imune. O conhecimento sobre a estabilidade genética do vírus define a vida útil do sistema lote semente permitindo aumentá-la de forma segura.

O conhecimento do sistema de indução do interferon em culturas de CEF pode contribuir para a otimização do processo de produção da vacina, possibilitando a obtenção de maiores rendimentos na produção de antígeno viral.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

- Análise da estabilidade genômica do vírus da vacina contra o sarampo, cepa Biken CAM-70, produzido em Bio-Manguinhos, ao longo de passagens em CEF;
- Estudo do sistema interferon induzido pela cepa CAM-70 em CEF.

3.2. Objetivos específicos

- Fazer 10 passagens seriadas do vírus semente (FMS-7) em CEF, em condições de produção;
- Seqüenciamento completo do vírus semente, da 3ª passagem e da 10ª passagem;
- Análise das seqüências obtidas em comparação com o vírus semente;
- Plaqueamento do vírus semente em CEF e análise da seqüência nucleotídica do gene N das placas de lise coletadas;
- Titulação do interferon induzido pelo vírus do sarampo cepa CAM-70 em CEF;
- Análise da expressão gênica de interleucinas induzidas pelo vírus do sarampo cepa CAM-70 em CEF.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Vírus

4.1.1 Vírus CAM-70

O vírus semente FMS-7 fica estocado a -70°C e uma amostra líquida congelada foi fornecida para este estudo pelo Departamento de Vacinas Virais de Bio-Manguinhos. A vacina CAM-70 liofilizada lote nº 96/SB005Z foi fornecida pelo Setor de Amostragem, do Departamento de Qualidade/Bio-Manguinhos, em frascos de cinco doses. Esta vacina foi obtida através de três passagens do vírus semente em culturas de fibroblasto de embrião de galinha (CEF) realizadas pelo Departamento de Vacinas Virais (Figura 1.5).

4.1.2 Vírus Sindbis

O vírus Sindbis é transmitido a aves selvagens por mosquitos do gênero *Culex*. Embora esteja comprovado que possa infectar o homem, geralmente não há doença clínica reconhecida. No entanto, em determinadas regiões geográficas, este vírus representa uma causa importante de febre, artrite e exantema.

Pela sua reconhecida sensibilidade ao interferon, o vírus Sindbis foi utilizado neste estudo em testes de detecção desta citocina, como vírus desafio.

Estoques de vírus Sindbis foram produzidos em CEF a partir de uma amostra cedida pela Dra. Amélia Travassos da Rosa (Instituto Evandro Chagas, Belém) e anteriormente amplificada em culturas de células Vero. Culturas de CEF numa densidade de $1,5 \times 5$ células/cm² foram preparadas de véspera em garrafas de 175 cm² e inoculadas com 1,5 ml de Sindbis. Após adsorção por 1h a 37°C , foi adicionado a cada garrafa um volume de 80ml de meio para garrafa. Em 24h já podia ser observado 90% de efeito citopático (CPE) e cada garrafa de cultura recebeu sorbitol para uma concentração final de 8 %. As culturas foram congeladas a -70°C , descongeladas, clarificadas por centrifugação e a suspensão viral aliquoteada e estocada a -70°C .

O vírus foi titulado em culturas de CEF e foi selecionada a maior diluição que produziu mais de 80% de CPE em 24h.

Todas as manipulações do vírus Sindbis atenderam às recomendações da Comissão Técnica de Biossegurança da FIOCRUZ para manipulação de microorganismos patogênicos.

4.2. Meios de Cultura e Soluções

Neste item estão listadas as diferentes formulações de meios de culturas utilizados neste estudo. O meio 10× concentrado (199 Earle's,) foi adquirido da Invitrogen, o SFB não inativado foi adquirido da Cultilab (inativado a 56°C por 30min), enquanto PBS (10X), tripsina solução estoque, bem como as soluções de antibióticos canamicina e eritromicina, foram produzidos pela estrutura do Laboratório de Sarampo (DEVIR/DIAPV/SEMES/Bio-Manguinhos), seguindo as normas de controle de qualidade já estabelecidas pela instituição (POPs: 106011-002; 106011-005; 106011-301). No LATEV os reagentes de cultura celular foram aliquotados e estocados, prontos para o uso.

Meio 199 com sais de Earle's para estabelecimento do cultivo celular

Meio 199 com sais de Earle's 10× (Invitrogen)	10 ml
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃) 4,4% (pH 7,0)	1,1 ml
Soro fetal bovino inativado (Cultilab)	2 ml
Canamicina 100.000mg/ml (Invitrogen)	100 µl
Eritromicina 10.000mg/ml (Invitrogen)	300 µl
Água bidestilada q.s.p.	100 ml

Material estéril; preparo no momento do uso.

Meio 199 com sais de Earle's para diluição do inóculo viral

Meio 199 com sais de Earle's 10× (Invitrogen)	10 ml
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃) 4,4% (pH 7,0)	3 ml
Soro fetal bovino inativado (Cultilab)	1 ml
Canamicina 100.000mg/ml (Invitrogen)	100 µl
Eritromicina 10.000mg/ml (Invitrogen)	300 µl
Água bidestilada q.s.p.	100 ml

Material estéril; preparo no momento do uso.

Earle's BSS 20×

Cloreto de sódio (NaCl)	1215 g
Cloreto de potássio (KCl)	7,2 g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	53,9 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	36 g
Fosfato de sódio monobásico (Na ₂ HPO ₄ .1H ₂ O)	24,5 g
Dextrose anidra	180 g
1% vermelho de fenol	90 ml
Água bidestilada q.s.p.	9000 ml

Esterilização por filtração em membrana 0,22 µm. Estocagem a temperatura ambiente.

Solução de Earle's para lavagem

Earle's BSS 20×	900 ml
Água bidestilada q.s.p.	18000 ml

Todo material estéril; preparo no momento do uso.

Meio 199 com sais de Earle's sem soro fetal bovino

Meio 199 com sais de Earle's 10× (Invitrogen)	10 ml
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃) 4,4% (pH 7,0)	3,5 ml
Canamicina 100.000mg/ml (Invitrogen)	100 µl
Eritromicina 10.000mg/ml (Invitrogen)	300 µl
Água bidestilada q.s.p.	100 ml

Material estéril; preparo no momento do uso.

Solução de sorbitol a 8%

Solução de sorbitol a 50%	1,9 ml
---------------------------	--------

Este volume deve ser acrescentado a cada garrafa de cultura contendo 10ml de meio.

Meio 199 com sais de Earle's para cultivo celular em garrafas

Meio 199 com sais de Earle's 10× (Invitrogen)	10 ml
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃) 4,4% (pH 7,0)	2,5 ml
Soro fetal bovino inativado (Cultilab)	5ml
Sulfato de gentamicina (4mg/ml) (Schering)	1ml
Água bidestilada q.s.p.	100 ml

Todo material estéril; preparo no momento do uso.

Meio 199 com sais de Earle's para cultivo celular em placas

Meio 199 com sais de Earle's 10× (Invitrogen)	10 ml
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃) 4,4% (pH 7,0)	5 ml
Soro fetal bovino inativado (Cultilab)	5 ml
Sulfato de gentamicina (4mg/ml) (Schering)	1 ml
Água bidestilada q.s.p.	100 ml

Todo material estéril; preparo no momento do uso.

Carboximetilcelulose (CMC) 1,5% - POP: 107020-302

CMC (Sigma)	1,5 g
Água bidestilada q.s.p.	100 ml

Homogeneização por agitação vigorosa (liquidificador). Esterilização por autoclavação a 121°C por 20min; armazenagem a temperatura ambiente.

Meio 199 com sais de Earle's e CMC

Meio 199 com sais de Earle's 10× (Invitrogen)	10 ml
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃) 4,4% (pH 7,0)	5 ml
Soro fetal bovino inativado (Cultilab)	5 ml
Sulfato de gentamicina (4mg/ml) (Schering)	1 ml
<i>Carboximetilcelulose</i> (CMC) 1,5% q.s.p. (Sigma)	100 ml

Homogeneizar por agitação vigorosa. Todo material estéril; preparo no momento do uso.

Agarose 0,6%

Agarose (Type I - Sigma)	0,6 g
Água bidestilada q.s.p.	100 ml

Esterilização por autoclavação a 121°C por 20 minutos. Estocagem a temperatura ambiente. Derreter em microondas afrouxando a tampa do frasco e deixar em banho-maria a 42°C até o momento do uso.

Meio 199 com sais de Earle's e agarose

Agarose 0,6%	100 ml
Meio 199 com sais de Earle's 10× (Invitrogen)	20 ml
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃) 4,4% (pH 7,0)	10 ml
Soro fetal bovino inativado (Cultilab)	10 ml
Sulfato de gentamicina (4mg/ml) (Schering)	2 ml
Água bidestilada q.s.p.	100 ml

Todo material estéril; preparo imediatamente antes do uso.

Bicarbonato de sódio 4,4% gaseificado (NaHCO₃) - POP: 107020-301

Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃) (Sigma)	44 g
Vermelho de fenol 1%	1 ml
Água bidestilada q.s.p.	1000 ml

Adicionar gelo seco sob agitação até a solução atingir pH 7,0–7,2. Separar em aliquotas de 20ml e esterilizar por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

Verseno (Solução estoque 5%) - POP: 107020-303

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Sigma)	50 g
Vermelho de fenol 1%	100 µl
Água bidestilada q.s.p.	1000 ml

Misturar e acertar o pH para 7,6 com NaOH 1N. Estocar a temperatura ambiente.

Verseno (Solução de trabalho)

Solução estoque de verseno	20 ml
Vermelho de fenol 1%	100 µl
PBS pH 7,6 q.s.p.	1000 ml

Homogeneizar, ajustar pH para 7,6 com NaOH 1N. Separar em alíquotas de 50ml, esterilizar por autoclavação a 121°C por 20 minutos. Estocar a temperatura ambiente.

Tripsina/verseno

Tripsina estoque (Invitrogen)	0,5 ml
Verseno	50 ml

Preparar imediatamente antes do uso.

Tampão fosfato/salina 0,01M pH 7,2 a 7,4 (PBS)

Cloreto de sódio (NaCl)	8 g
Cloreto de potássio (KCl)	0,2 g
Fosfato de sódio dibásico (NaH ₂ PO ₄ .7H ₂ O)	2,18 g
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,2 g
Água bidestilada q.s.p.	1000 ml

Esterilização por filtração em membrana 0,22 µm. Estocagem a temperatura ambiente.

Vermelho neutro (solução estoque)

Vermelho neutro (Sigma N 4638)	0,5 g
Água bidestilada q.s.p.	50 ml

Esterilizar por autoclavação a 121°C por 15 minutos. Estocar a 4°C ao abrigo da luz.

Meio 199 com sais de Earle's e vermelho neutro

Meio 199 com sais de Earle's 10× (Invitrogen)	1ml
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃) 4,4% (pH 7,0)	0,15 ml
Sulfato de gentamicina (4mg/ml) (Schering)	0,1 ml
Água bidestilada	9 ml
Vermelho neutro sol. estoque	0,33 ml

Todo material estéril; preparo no momento do uso.

Formaldeído 10%

Formaldeído 37% (Merck)	1000 ml
Água destilada	2700 ml

Preparar e estocar a temperatura ambiente.

Cristal violeta - Solução Estoque (2%)

Cristal Violeta (Sigma)	10 g
Metanol (Merck)	100 ml
Água destilada	500 ml

Estocagem a temperatura ambiente.

Cristal violeta - Solução de uso (0,04%)

Cristal Violeta estoque	20 ml
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Estocagem a temperatura ambiente.

Acetato de amônio 7,5 M

Acetato de amônio (Sigma)	28,87g
Água bidestilada q.s.p.	50ml

Estocar a 4°C.

Acetato de sódio 3M pH 5,2

Acetato de sódio (Sigma)	20,4g
Água bidestilada q.s.p.	50ml

Instruções: Acertar pH com ácido acético. Estocar a 4°C.

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,5 M (pH 8,0)

EDTA (Sigma)	186,1g
Água bidestilada q.s.p.	1000ml

Ajustar pH até 8,0 com pastilhas de NaOH. Estocar a 4°C.

Tris 1 M (pH 7,6)

Tris base (Sigma)	121,1g
Água bidestilada q.s.p.	1000ml

Instruções: Ajustar pH até 7,6 com HCl 1N. Estocar a 4°C.

TAE (solução de estoque 50×)

Tris base (Sigma)	242g
Ácido acético glacial (Merck)	57,1ml
EDTA 0,5M (pH 8,0)	100ml
Água bidestilada q.s.p.	1000ml

Instruções: Estocar temperatura ambiente.

Tampão Tris 10 mM/EDTA 1mM (TE) pH 7,6

Tris 1M (pH 7,6)	10ml
EDTA 0,5M (pH 8,0)	2ml
Água bidestilada q.s.p.	1000ml

Instruções: Após o preparo autoclavar a 121°C por 20 minutos e estocar a 4°C.

DEPC (Sigma)

Solução de tratamento de material contra RNase: 0,01% em água bidestilada. Incubar por 24h a temperatura ambiente e esterilizar por autoclavação a 121°C por 20 minutos; armazenagem a temperatura ambiente.

4.3. Culturas celulares

4.3.1 Preparo de culturas de fibroblastos de embrião de galinha

As culturas foram preparadas pelo método de Rubin (1973), a partir de ovos de galinha livres de patógenos específicos (SPF = “specific pathogen free”), com embriões de 11 dias. Os embriões foram retirados dos ovos de forma asséptica e as cabeças e vísceras removidas e descartadas. Os corpos foram lavados com PBS, e passados através de seringas de 50 ml diretamente para um frasco de tripsinização pré-pesado. O frasco foi, então, pesado novamente para determinação do peso úmido de tecido. O extrusado foi lavado duas vezes com PBS (8ml/g) e o líquido drenado. Adicionou-se 4ml de tripsina por grama de tecido e o material foi mantido sob agitação magnética vigorosa por 1h a 37°C. Acrescentou-se soro fetal bovino inativado a 10% v/v e centrifugou-se a 1000×g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e as células ressuspensas em meio de estabelecimento. A suspensão foi filtrada em tela de nylon com malha de 140 µm e 5ml foram transferidos para um tubo de hematócrito e submetidos a centrifugação a 1000×g por 10 minutos a 4°C. No tubo de hematócrito, 0,15% v/v de células sedimentadas equivalem a 1×10^6 células/ml. As células foram diluídas em meio de estabelecimento de acordo com a densidade necessária, semeadas e incubadas a 37°C.

4.3.2 Preparo de células Vero

As células Vero são uma linhagem contínua de células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (Rhim *et al.*, 1969). A linhagem certificada CCL-81 (Certified Cell line) foi adquirida do American Type Culture Collection (Manassas, VA) na 120ª passagem. O número de passagens foi limitado através de um sistema de lote semente onde, a partir de uma semente secundária congelada em ampolas mantidas em nitrogênio líquido (-196°C), as células são utilizadas por até 10 passagens. As células são cultivadas em garrafas descartáveis de 175 cm² (Corning, New York, USA) com meio 199 Earle’s para cultivos celulares em garrafa e a manutenção das culturas é feita através de passagens semanais na proporção de 1:8 em relação à cultura da garrafa original (POP: 0256).

Para uso, as monocamadas celulares confluentes cultivadas em frascos de manutenção foram lavadas duas vezes com uma solução de tripsina/verseno e incubadas com 0,5 ml da mesma solução a 37°C por cerca de 5 minutos. As células foram, então, ressuspensas com 5 a 10 ml de meio 199 Earle’s para cultivos celulares em placas e o número de células estimado

através de contagem em hemocitômetro. A densidade celular foi ajustada para $1,5 \times 10^5$ células/cm² e as células foram semeadas em placas de 24 orifícios, 24h antes do uso.

4.4 Passagens do vírus semente em fibroblastos de embrião de galinha

As células foram semeadas numa densidade de $1,4 \times 10^5$ células/cm², 300 ml de suspensão por garrafa, em garrafas *roller* de 850 cm² utilizando o meio 199 Earle's para estabelecimento do cultivo celular. Após 48 h de incubação em estufa *roller* a 37°C, o meio de cultura foi removido e inoculados 10 ml de vírus diluído a 1:100 em meio 199 Earle's para diluição do inóculo viral. Após 2h de adsorção em incubadora *roller* a 30°C, foram acrescentados 110 ml do mesmo meio usado na diluição do vírus. As culturas foram reincubadas por cinco dias a 30°C. O meio de cultura foi, então, retirado e as camadas celulares lavadas duas vezes com 120 ml de solução de Earle's BSS. Foram acrescentados 120 ml de meio 199 Earle's sem soro e as culturas incubadas a 30°C. No oitavo dia pós-infecção (pi) as camadas celulares infectadas receberam sorbitol para uma concentração final de 8% na cultura e foi realizado o congelamento das culturas por rotação das garrafas em banho de gelo seco com etanol. Após o descongelamento, as suspensões celulares foram clarificadas por centrifugação, alíquotadas e congeladas a -70°C.

O vírus semente foi submetido a dez passagens em CEF e os vírus obtidos foram denominados VSF-1 a VSF-10 de acordo com o número de passagens.

4.5. Purificação de placas de lise do vírus semente

Os plaqueamentos foram realizados de acordo com o método de Dulbecco (1954). O vírus semente FMS-7 foi inoculado num volume de 0,1ml/9,6cm² em placas descartáveis estéreis de 6 orifícios semeadas com CEF numa densidade de $1,4 \times 10^5$ células/cm². Após a adsorção do vírus à camada celular por 1h a 37°C numa incubadora com 5% CO₂, o inóculo foi removido e substituído por 3ml de meio 199 Earle's contendo 0.6% de agarose. Após sete dias de infecção a 37°C as culturas foram coradas com vermelho neutro em meio de cultura numa concentração final de 0,033%. Para coleta dos vírus das placas de lise, o excesso de corante foi removido por aspiração e um tampão de agarose e células infectadas foi aspirado de placas de lise selecionadas e ressuspenso em 400µl de meio 199 Earle's para diluição do inóculo viral. Cada suspensão de placa de lise foi propagada através de uma passagem em CEF para obter estoque suficiente para produção de RNA. As células foram semeadas numa

densidade de $1,4 \times 10^5$ células/cm², 10 ml de suspensão por garrafa, em garrafas de 25 cm², utilizando meio 199 Earle's para cultivo celular em garrafas. Após 48h de incubação a 37°C, o meio foi retirado e os 400µl relativos a cada placa de lise, inoculados. As culturas foram incubadas para adsorção viral por 2h a 30°C. Após a adsorção foram adicionados 9,6 ml de meio para inoculação e as culturas foram reincubadas a 30°C por até 12 dias. As culturas receberam sorbitol para uma concentração final de 8% no meio de cultura e foram congeladas. Após o descongelamento as suspensões foram clarificadas por centrifugação, alíquotadas e congeladas a -70°C.

4.6. Síntese de DNA complementar, amplificação e seqüenciamento nucleotídico

O RNA total das suspensões virais foi extraído com TRIzol[®] LS (Invitrogen) usando 20-40µg de glicogênio como carreador. O TRIzol[®] é um solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, sendo esse método de extração originalmente descrito por Chomczynski e Sacchi (1987). O RNA do vírus semente foi extraído diretamente da amostra fornecida sem propagação em CEF para evitar potenciais mutações. Rotineiramente, os RNAs eram ressuspensos em 30 µl de água RNase/DNase free (Invitrogen) para utilização na síntese de DNA complementar. Entretanto, em regiões de difícil amplificação, o RNA era utilizado três vezes concentrado.

A síntese do DNA complementar (RT) foi realizada usando um kit ThermoScript[™] RT-PCR (Invitrogen) e hexâmeros randômicos. A amplificação foi feita usando a enzima *Taq* DNA Polymerase Platinum[®] High Fidelity (Invitrogen). Um número total de 16 produtos de PCR foram sintetizados, compreendendo os nucleotídeos 1-1040, 951-2240, 1825-2631, 2206-3900, 3558-4274, 3865-4463, 3916-5150, 5022-5866, 5401-7058, 6958-8647, 8552-10050, 9983-11531, 11491-12993, 12465-13466, 12961-14474 e 14451-15877 (Figura 4.1). Para o material obtido da purificação de placas de lise, foram sintetizados dois produtos de PCR, compreendendo os nucleotídeos 951-1335 e 1521-1907. Os produtos de PCR foram purificados usando QIAquick PCR Purification kit (Qiagen). Os produtos purificados foram submetidos a seqüenciamento direto com o kit BigDye terminator mix versão 3.1 (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Para o seqüenciamento foram utilizados 83 oligonucleotídeos (Figura 4.2). A eletroforese dos produtos fluorescentes foi realizada utilizando o equipamento ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). As seqüências nucleotídicas foram analisadas e uma seqüência consenso para cada genoma viral ou região foi derivada de seqüências contíguas através do programa SeqMan II do pacote Lasergene versão 4.05 (DNAS^tar).

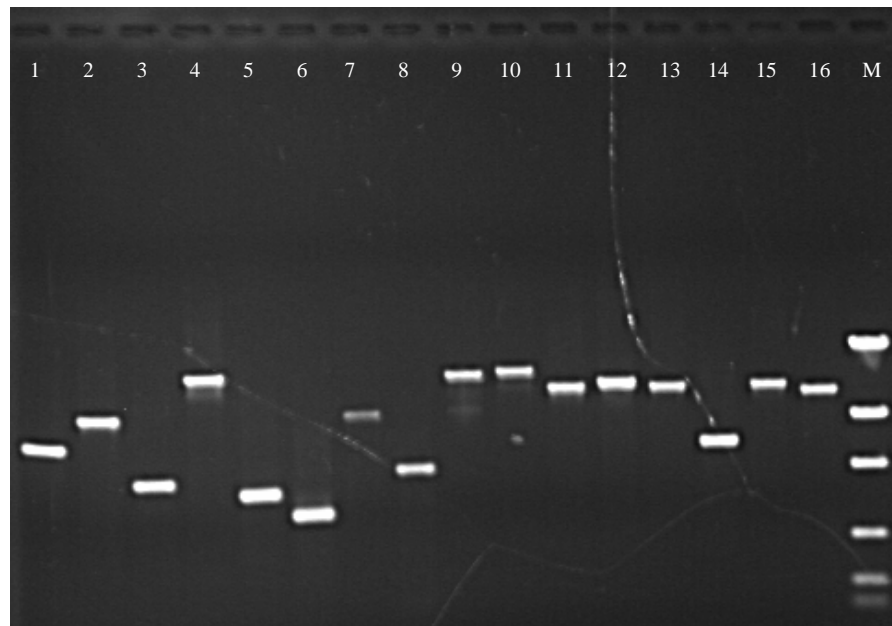


Figura 4.1. Análise dos 16 fragmentos obtidos por transcrição reversa seguida de amplificação por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) dos genomas virais de FMS-7, VSF3 e VSF-10, utilizando os pares de oligonucleotídeos iniciadores: 1= 1+S-1040A; 2= 951S-2240A; 3= 1825S-2631A; 4= 2206S-3900A; 5= 3558S-4274A; 6= 3875S-4463A; 7= 4455S-5150A; 8= 5022S-5866A; 9= 5401S-7058A; 10= 6958S-8647A; 11= 8552S-10050A; 12= 9983S-11531A; 13= 11491S-12992A; 14= 12465S-13466A; 15= 12961S-14474A; 16= 14451S-15877A; M = marcador de peso molecular (Low DNA mass ladder, Invitrogen).

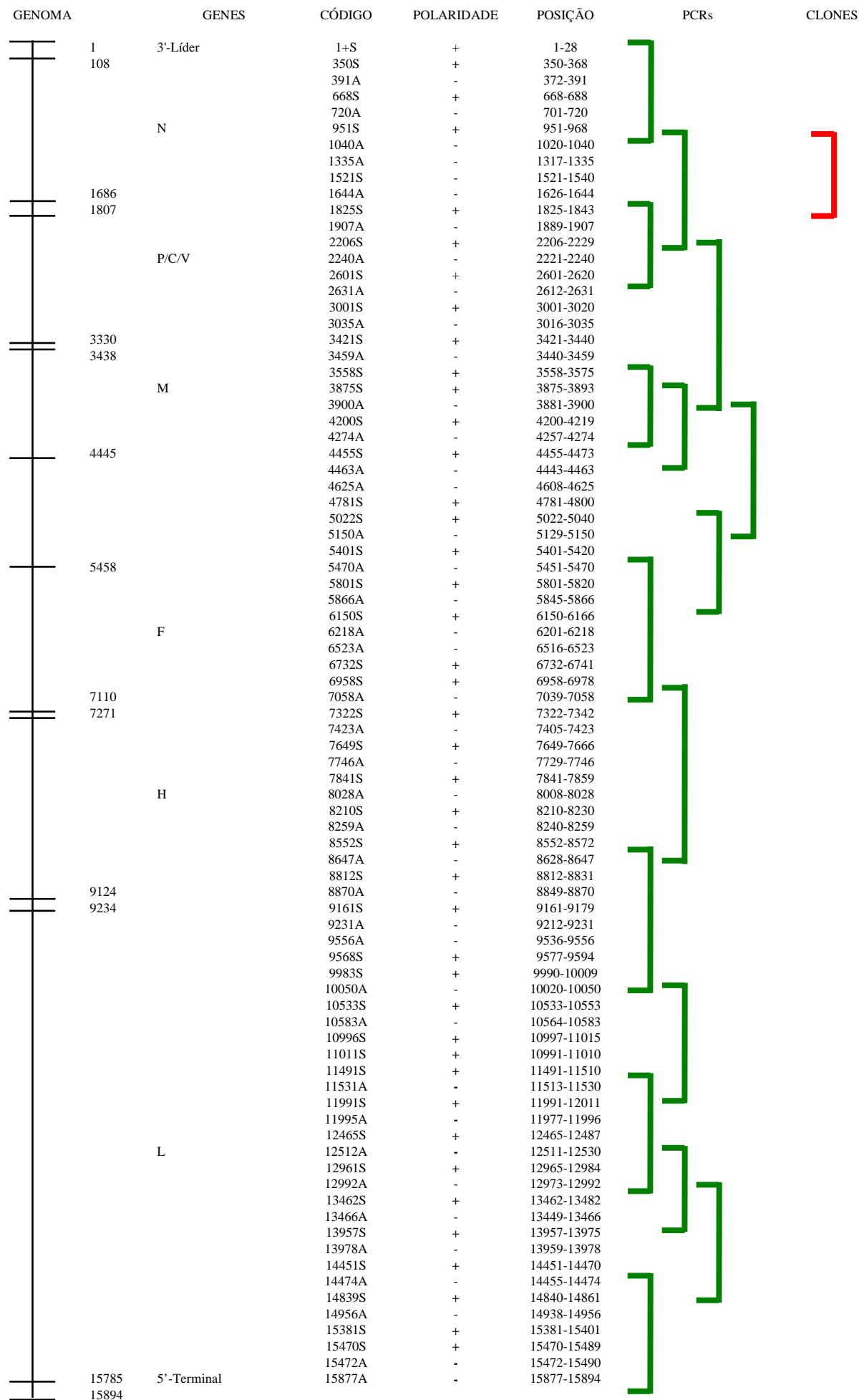


Figura 4.2. Esquema geral do genoma do vírus do sarampo CAM-70 e lista dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos fragmentos e para o seqüenciamento.

4.7. Síntese de DNA complementar, amplificação e seqüenciamento nucleotídico dos vírus obtidos de placas de lise

A mesma metodologia e os mesmos kits do item 4.6 foram utilizados nesta etapa do trabalho, com algumas adaptações. Os RNAs extraídos fora ressuspensos em volumes de 10 µl. De acordo com a literatura, a região utilizada para genotipagem fica compreendida entre os nucleotídeos 1233 e 1682. Um fragmento compreendido entre os nucleotídeos 950 e 1907 foi amplificado por PCR e para a reação de seqüenciamento foram acrescentados os oligonucleotídeos internos 1335 e 1521.

4.8 Cultivo do vírus CAM-70 em fibroblastos de embrião de galinha para estudo do interferon

As células foram preparadas como descrito no item 4.3 e cultivadas em garrafas de 25cm² em duas densidades celulares diferentes denominadas alta densidade (AD) com 6×10⁵ células/cm² e baixa densidade (BD) com 1×10⁵ células/cm². Após 48h de cultivo, as monocamadas foram infectadas com 1ml de suspensão viral de CAM-70 VSF-2. As culturas foram incubadas por 2h a 30°C para adsorção do vírus. Após este período, o meio foi repostado e as culturas reincubadas por até 15 dias. Diariamente, foram coletadas uma garrafa AD infectada e uma garrafa AD controle para extração de RNA total. Para titulação viral e titulação de interferon foram coletadas quatro garrafas: Uma AD infectada, uma AD controle, uma BD infectada e uma BD controle. Foram feitas três cinéticas de replicação viral usando diferentes multiplicidades de infecção (MOI). No experimento 1, as culturas em AD e BD foram infectadas com MOIs iguais de 0,08; no experimento 2 foram inoculados 5,17 PFU para as duas densidades celulares, resultando em MOI de 0,022 para AD e 0,132 para BD; no experimento 3 as culturas foram infectadas com MOI de 0,05. Os experimentos 1 e 2 foram acompanhados por 15 dias e o experimento 3 por 10 dias.

4.9 Titulação do interferon em fibroblastos de embrião de galinha

A metodologia utilizada neste ensaio foi descrita por Rubinstein e colaboradores (1981) e baseia-se na medida da redução do efeito citopático do vírus Sindbis frente uma cultura de células (CEF) tratada com uma amostra que contém interferon (culturas do vírus CAM-70 em BD e AD). O vírus Sindbis é sensível ao IFN e por esta razão foi utilizado no ensaio.

As culturas foram colhidas diariamente, congeladas e descongeladas, clarificadas e separadas em alíquotas de 0,5ml devidamente identificadas. As alíquotas foram estocadas em freezer -70°C para posterior titulação pelo método de contagem de placas de lise em células Vero em para titulação do IFN.

Vinte e quatro horas antes do teste, placas de 96 orifícios foram semeadas com uma suspensão de células CEF na concentração de 2×10^5 células/cm² em meio para placas e as culturas recém-preparadas incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂.

No dia do teste, o vírus CAM-70 contido nas culturas de CEF foi inativado através da incubação a 56°C por 1h. Os controles das culturas sem vírus (controle negativo) também foram tratados pelo calor. Para a confirmação da inativação do vírus, 100µl de todas as amostras foram inoculados em culturas de células Vero contendo $1,5 \times 10^5$ células/cm² em placas de 24 orifícios, preparadas de véspera. Essas culturas foram incubadas por 1h a 37°C em atmosfera de 5% CO₂, para a adsorção do vírus. Em seguida o inoculo foi retirado e foi adicionado 1ml de meio contendo carboximetilcelulose a 1,5%. As culturas foram então incubadas por mais sete dias, e após esse período as monocamadas foram fixada com formaldeído 10%, coradas com cristal violeta 0,04% e analisadas para avaliação da presença de placas de lise.

Para o teste do interferon propriamente dito, as amostras foram diluídas em placas de cultura de 96 orifícios com meio 199 Earle's para cultivos celulares em placas, da seguinte maneira: as suspensões provenientes das culturas infectadas com CAM-70, bem como os controles negativos foram adicionados aos orifícios da primeira coluna (1A-F) das placas (todas as amostras foram testadas em duplicata) e diluídos 1:8 em meio para um volume final de 220µl. A todas as colunas restantes (2-10) foram adicionados 110µl de meio, e diluições seriadas na base dois foram feitas transferindo-se 110µl, de uma coluna para a seguinte, até atingir a décima coluna da placa. Esse procedimento resultou numa diluição da amostra inicial de 4096 vezes. As duas últimas colunas (11 e 12) da placa de 12 colunas foram utilizadas para o controle de vírus. As duas últimas linhas (G e H) da placa foram utilizadas para o controle de células. Em seguida todo o meio das placas contendo as culturas foi retirado e 100µl das diluições acima descritas foram transferidos para as placas contendo as células. Os controles de vírus e células receberam apenas 100µl de meio. As placas foram incubadas por 24h como descrito acima. No dia seguinte, as células foram desafiadas com vírus Sindbis. Sem retirar o sobrenadante das placas, eram adicionados 100µl de uma diluição 1/128 de um estoque do vírus produzido em nosso laboratório, concentração mínima necessária para provocar mais de 80% de efeito citopático em culturas de CEF não tratadas. Apenas meio foi adicionado ao controle de células, e apenas suspensão viral de Sindbis foi adicionada às duas últimas

colunas da placa. As culturas foram novamente incubadas por 24h como descrito acima. Após esse período, as células foram fixadas com a adição de 200µl de formaldeído 10% e coradas com cristal violeta 0,04%. As placas foram analisadas visualmente e descoradas através de rápida incubação com 200µl de etanol contendo 1% HCl. Um volume de 100µl de cada orifício foi transferido para uma placa de ELISA e a absorbância a 540nm determinada em leitor de ELISA (ICN Titertek Multiskan MCC/340). A leitura dos orifícios dos controles de células permitiu estimar a densidade óptica (DO) que representaria 50% de destruição da monocamada (“end-point”). O cálculo foi realizado através de regressão linear usando as diluições e as médias das leituras imediatamente inferiores e superiores à leitura do “end-point” para estimar a diluição que representaria 50% de efeito. Os títulos de interferon foram expressos em recíproca da diluição.

4.10 Titulação viral por contagem de placas de lise

A titulação viral foi realizada em monocamadas de células Vero. A dosagem dos títulos virais foi realizada pela contagem do número de placas de lise produzidas em monocamadas de células Vero, sob meio contendo carboximetilcelulose a 1,5%. Foram usadas placas de 24 orifícios, com células Vero semeadas à densidade de 150.000 células/cm², 24 horas antes do uso. Para a infecção, foram feitas diluições seriadas (10⁻¹ a 10⁻⁶) da suspensão viral e inoculação da monocamada com 100µl de cada diluição, com incubação de 1h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, com agitação periódica. Em seguida, o inóculo foi retirado e adicionado 1ml de meio contendo carboximetilcelulose a 1,5%. As culturas foram reincubadas por sete dias em estufa à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, as monocamadas foram fixadas com formaldeído 10% e coradas com cristal violeta 0,04%. As placas de lise presentes em cada diluição foram contadas e o número de unidades formadoras de placas (PFU) por ml de amostra foi calculado.

O cálculo do título viral foi feito segundo a fórmula: log₁₀ do nº médio de placas de lise/orifício + log₁₀ diluição correspondente + log₁₀ 10 (fator de correção do volume para 1 ml uma vez que um volume de 100µl foi usado como inóculo). Desta forma, os valores foram expressos em log₁₀ PFU/ml.

4.11 Isolamento de RNA total de fibroblastos de embrião de galinha para estudo do interferon

O RNA total de *Gallus gallus* foi isolado a partir da monocamadas de culturas de células CEF utilizando o reagente TRIzol LS® (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante. Foram realizados dois grupos de experimentos. Diariamente, duas culturas, sendo uma infectada e outra controle em AD, foram tripsinizadas, ressuspensas em 1ml de meio, e suas células contadas. A quantidade de células obtida foi ajustada para conter 5×10^6 células/ml. Este procedimento foi repetido diariamente até o fim do experimento, e o número de células foi utilizado para a normalização das amostras provenientes de diferentes dias de cultura de modo que o RNA fosse extraído do mesmo número de células independentemente do tempo de cultura. Às alíquotas de 250µl foram adicionados 750µl de Trizol LS® (Invitrogen), agitou-se em vortex por 15 segundos e congelou-se em freezer a -70°C.

O RNA extraído foi ressuspensão em 16µL de H₂O livre de RNase e DNase (Promega, Madison, USA) e em seguida tratado com DNase I livre de RNase (1U/µL, Epicentre), em um volume de 20µL com 1x PCR buffer II (50mM KCl e 10mM Tris-HCl pH 8,3 - Applied Biosystems), 2mM MgCl₂ e 4U DNase I. Os tubos foram incubados por 30min a 37°C e a reação terminada pela adição de 150µL de TE e 200µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 v/v). Os tubos foram agitados vigorosamente e centrifugados por 3min a 14.000g em microcentrífuga (Eppendorf, Hamburg, Germany). A fase aquosa resultante foi transferida para um novo tubo e em seguida foi feita a precipitação do RNA pela adição de ½ volume de 7,5M de acetato de amônio e 2 volumes de etanol absoluto. Os tubos foram agitados e incubados por 15min a temperatura ambiente e em seguida centrifugados por 15min a 14.000g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 75%. O RNA foi ressuspensão em um volume de 20µL de H₂O livre de RNase e DNase (Promega).

4.12 Síntese de DNA complementar e amplificação dos genes ligados à via do interferon

Para a análise da expressão dos genes ligados à via do IFN, a partir do RNA total obtido de cultura de células CEF, utilizamos a metodologia RT-PCR. O equipamento GeneAmp System 9700 (Applied Biosystems) e as reações foram realizadas utilizando o kit “GeneAmp Gold RNA PCR Reagent Kit” (Applied Biosystems).

Inicialmente, 4µL de RNA total e 1µL de oligo dT (1,25µM) foram aquecidos a 90°C por 5min e resfriados a temperatura ambiente. Ao RNA e oligo dT foram adicionados 15µL de uma mistura contendo 1x RT-PCR Buffer (15mM Tris-HCl pH 8,3 e 10mM KCl), 2,5mM

MgCl₂, 250µM de cada dNTP, 10U de inibidor de RNase, 10mM DTT, 15U de transcriptase reversa MultiScribe (Applied Biosystems, Foster City, USA). Os tubos foram incubados por 10 minutos a 25°C e 12 minutos a 42°C. A cada 10µL de cDNA obtidos foram adicionados, em um volume de 15µL, uma mistura contendo 1X RT-PCR Buffer (15mM Tris-HCl pH 8,3 e 10mM KCl), 1,75mM MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 0,20µM de cada oligonucleotídeo específico para a amplificação da interleucinas (Tabela 4.3) e 2,5U da DNA polimerase AmpliTaq Gold. Essa mistura foi aquecida por 10min a 95°C para a ativação da Taq polimerase, e submetida a 35 ciclos a: 1) 95°C por 30s; 2) 55°C por 30s e; 3) 72°C por 1 minuto.

Para as culturas destinadas à extração de RNA as células eram contadas e as quantidades normalizadas entre os pontos, como descrito no item 4.11, no entanto, pequenas variações nas contagens das células bem como na eficiência da extração de RNA total poderiam ser introduzidas durante o experimento. Para comparar os níveis de amplificação entre as amostras, um controle positivo de amplificação do gene da β-actina, um gene constitutivo, foi introduzido a cada teste, e o nível de fluorescência das bandas amplificadas de cada ponto comparadas visualmente. Além disso, um controle negativo de amplificação era feito a cada RT-PCR, onde a mistura de reação sem a adição de RNA era submetida a todas as etapas de amplificação, a fim de garantirmos que nenhum RNA ou DNA contaminante poderia ter sido acidentalmente adicionado à mistura.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% (m/v), em TAE 1X juntamente com marcador de massa e tamanho molecular (Low DNA mass ladder, Invitrogen) e coloração posterior com brometo de etídio.

Tabela 4.1. Desenho dos oligonucleotídeos para análise de expressão de interleucinas de *Gallus gallus*, segundo autores abaixo

Nº do óligo	Nome do	Seqüência	Tamanho/ Direção	Descrição do Oligonucleotídeo	Tamanho do produto	Posição no mRNA	Referência
1	CEF05	5'-CCCCCGTGCTGTGTTCCCATCTATCG-3'	26mer / (+)	Beta Actina AN: X00182	248bp	78 – 103	Kost <i>et al.</i> , 1983.
2	CEF06	5'-GGGTGCTCCTCAGGGGCTACTCTCAG-3'	26mer / (-)			280 – 305	
3	CEF23	5'-TGCCGACGTGGTGCTCTTCATCAACT-3'	26mer / (+)	25OAS – locus A (AN: AB002585)	449bp	210 - 235	Yamamoto <i>et al.</i> , 1998.
4	CEF24	5'-TGGGGTACTTCGGCTCAACATCTCCTT-3'	28mer / (-)	e B; (AN: AB002586)		658 - 631	

4.13 Análise comparativa dos genomas de CAM-70 e de cepas vacinais de sarampo publicadas no GenBank

As regiões codificantes e não-codificantes da cepa vacinal CAM-70 analisada neste trabalho foram comparadas com as seqüências genômicas completas de outras vacinas de sarampo depositadas no GenBank. Seguem abaixo as cepas vacinais estudadas e seus respectivos números de acesso ao GenBank: Edmonston selvagem = AF266288; CAM-70 = DQ345721; as cepas Schwarz = AF266291 e Moraten = AF266287, que partilham seqüências genômicas idênticas; AIK-C = AF266286; Edmonston-Zagreb = AY486084; Rubeovax = AF266289; Changchun-47 = AF128250. As seqüências genômicas dos isolados selvagens que deram origem a diversas vacinas não derivadas da cepa Edmonston não estão disponíveis. Portanto, para efeito de comparação e devido à grande semelhança entre os vírus selvagens do genótipo A e as cepas vacinais, o isolado Edmonston selvagem foi considerado como o progenitor comum a todas as vacinas analisadas.

5. RESULTADOS

5.1 Seqüenciamento do vírus semente e das passagens

A estabilidade genética do vírus do sarampo cepa vacinal CAM-70 foi avaliada após 10 passagens do vírus semente FMS-7, realizadas em condições de produção da vacina contra o sarampo. Foi realizado o seqüenciamento nucleotídico direto dos cDNAs amplificados do vírus semente FMS-7, de sua terceira passagem, correspondente à vacina propriamente dita e da décima passagem. As três seqüências obtidas foram depositadas no GenBank e revelaram resultados idênticos (Tabela 5.1).

Duas heterogeneidades (T/C) encontradas nas posições 5180 e 5187 do genoma de FMS-7 foram mantidas na terceira e na décima passagem. Estas heterogeneidades estão localizadas no espaço intergênico entre os genes M e F (Figura 5.1).

A tabela 5.1 apresenta as diferenças nucleotídicas entre os resultados obtidos neste estudo, os de Rota e colaboradores (1994) e Santos e colaboradores (2003), que também seqüenciaram alguns genes de CAM-70. No gene P, posição 2545 do genoma, encontramos o códon TTG, diferentemente de Santos e colaboradores (2003), que identificaram CTG. Nessa posição a alteração é silenciosa. Na posição 3041 encontramos AGA, que corresponde a arginina e Santos e colaboradores (2003) encontraram AAA que corresponde à lisina. No gene H, posição 7548, identificamos o códon ATA que equivale a uma isoleucina e Rota e colaboradores (1994) acharam ACA que codifica para treonina. Na região não-traduzida do gene H, posições 9144 e 9203, encontramos os nucleotídeos A e G. Rota e colaboradores (1994) encontraram T e A, respectivamente.

Tabela 5.1. Alterações nucleotídicas e de aminoácidos entre seqüências de CAM-70

Posição	Gene	Seqüência	Seqüência	Seqüência	Expressão
		DQ345721 ^a	AF517559 ^d	U03649 ^e	
		DQ345722 ^b			
		DQ345723 ^c			
2545	P	TTG	CTG	-	silenciosa
3041	P	AGA	AAA	-	R→K
7548	H	ATA	-	ACA	I→T
9144	H	A	-	T	não traduzida ^f
9203	H	G	-	A	não traduzida

^a Genbank n° de acesso para terceira passagem de CAM-70;

^b Genbank n° de acesso para lote semente de FMS-7;

^c Genbank n° de acesso para décima passagem de CAM-70;

^d Genbank n° de acesso para Santos *et al*, 2003;

^e Genbank n° de acesso para Rota *et al*, 1994;

^f região não traduzida do gene

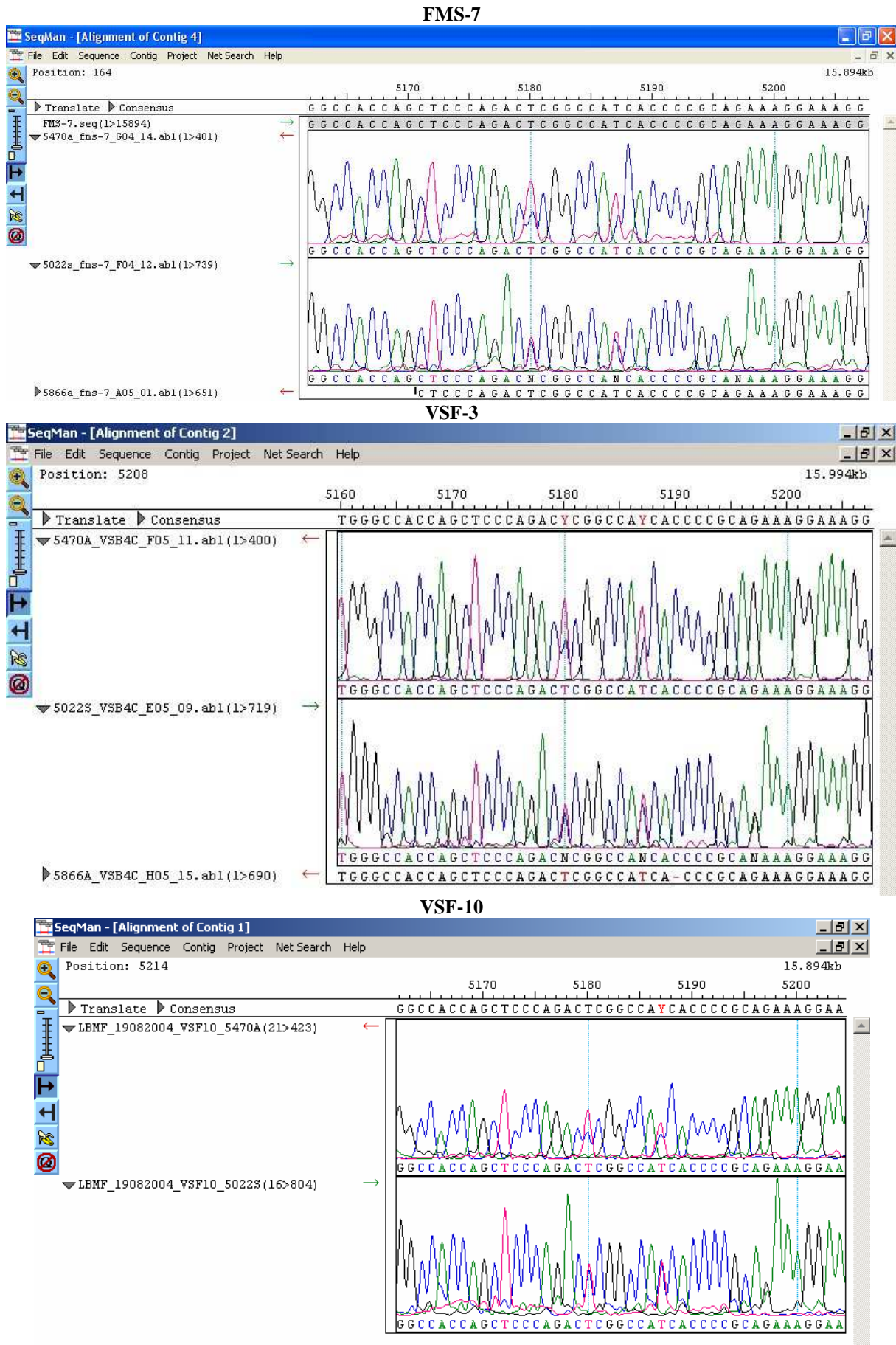


Figura 5.1. Cromatogramas mostrando as heterogeneidades nas posições 5180 e 5187 do genoma de FMS-7, VSF-3 e VSF-10.

5.2 Seqüenciamento dos vírus obtidos da placas de lise

Com o intuito de identificar a presença de sub-populações virais, o vírus FMS-7 foi inoculado em culturas de CEF preparadas em placas de seis orifícios e recobertas com meio de cultura contendo agarose. Os vírus originados de placas de lise suficientemente afastadas umas das outras foram coletados e analisados quanto à seqüência de 450 nucleotídeos da região C-terminal do gene N.

Quinze placas de lise foram selecionadas, propagadas por uma passagem em CEF, testadas para determinação do título viral e amplificadas por RT-PCR (Tabela 5.2). Destas, pudemos detectar título viral em nove, das quais sete foram positivas por RT-PCR. A região analisada revelou seqüências idênticas à do vírus FMS-7 para as sete amostras. A seqüência da amostra 9 apresentou uma heterogeneidade (C/T), na posição 1370, em relação à seqüência de FMS-7 (T), porém, sem acarretar alteração de aminoácido (Figura 5.2).

Tabela 5.2. Resultados da titulação viral e PCR dos vírus coletados das placas de lise

Placa de lise	Título (\log_{10} pfu/ml) ^a	PCR
1	5.42	+
2	4.7	+
3	<1.3	-
4	3.13	-
5	4.41	+
6	4.74	+
7	5.41	+
8	<1.3	-
9	5.6	+
10	<1.3	-
11	<1.3	-
12	<1.3	-
13	4.88	-
14	5.34	+
15	<1.3	-

^a Limite de detecção da titulação = \log_{10} 1.3 pfu/ml.

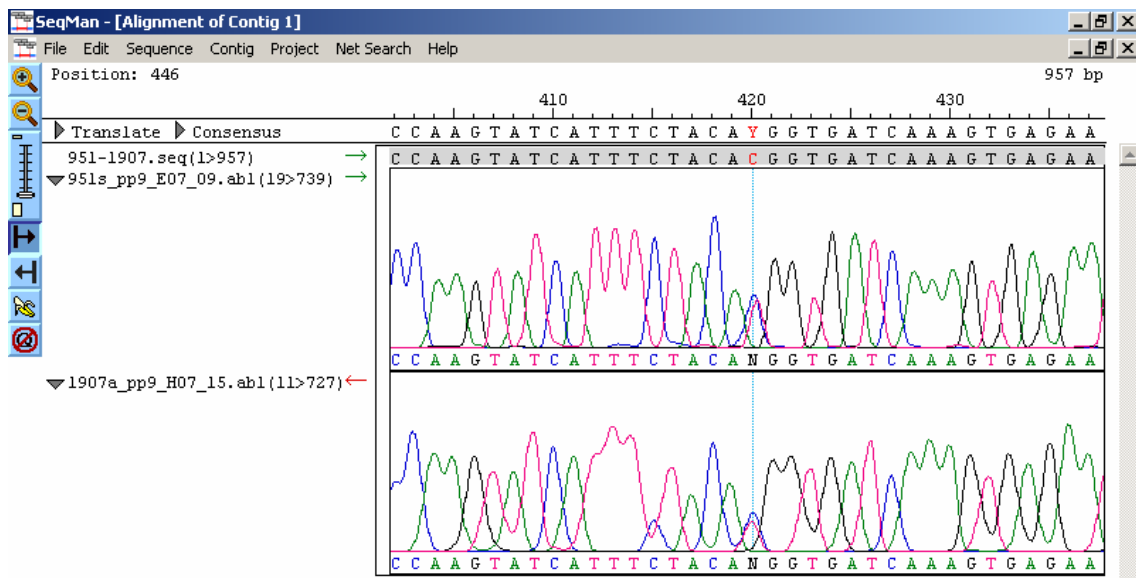


Figura 5.2. Cromatograma mostrando a heterogeneidade na posição 1370 do genoma da amostra 9, coletada de placa de lise formada por FMS-7 em cultura de CEF.

5.3 Análise comparativa dos genomas da cepa vacinal CAM-70 e os de outras vacinas de sarampo

Os alinhamentos das regiões codificantes e não-codificantes da cepa vacinal CAM-70 analisada neste trabalho com as seqüências genômicas de outras vacinas de sarampo depositadas no GenBank estão demonstrados na tabela 5.3 e o número de alterações nucleotídicas está demonstrado na tabela 5.4. O alinhamento completo das sequências pode ser visto no anexo I. As alterações nucleotídicas observadas entre as cepas vacinais estão distribuídas nas 13 regiões distintas do genoma (tabela 5.4). Há um total de 71 diferenças nucleotídicas na CAM-70 em relação à Edmonston selvagem. Dez alterações estão localizadas em regiões não-codificantes e 61 nas regiões codificantes, provocando alterações de aminoácidos. Os resultados dos alinhamentos demonstram que a cepa CAM-70 é a mais divergente enquanto que a Edmonston-Zagreb é a mais semelhante à Edmonston selvagem, com 99,55% e 99,8% de similaridade, respectivamente. Quinze alterações nucleotídicas ocorrem na mesma posição do genoma em todas as vacinas estudadas, resultando em 10 mudanças de aminoácidos. Estas mudanças não estão restritas a nenhuma região específica e encontram-se espalhadas pelo genoma. Uma substituição codificante na posição 8906 do genoma foi comum a todas as vacinas exceto para Edmonston-Zagreb, que não mudou. A região 3'-líder apresenta uma mudança de nucleotídeo comum a todas as vacinas (posição 26), outra comum a todas as vacinas com exceção de Edmonston-Zagreb (posição 42) e duas alterações específicas para Edmonston-Zagreb (posições 42 e 96). A região 5'-trailer apresenta uma alteração específica para cada um dos seguintes vírus: AIK-C (posição 15789), CAM-70 (posição 15795) e Edmonston-Zagreb (posição 15843).

O maior acúmulo de substituições dentre as regiões não-codificantes da CAM-70 encontra-se na região não traduzida entre os genes M e F, somando quatro alterações. O gene P da CAM-70 mostrou-se o mais divergente com 12 mutações exclusivas e duas mutações comuns a todas as vacinas.

A divergência genética entre a cepa CAM-70 e as outras cepas vacinais também pode ser verificada quando analisamos a árvore filogenética da figura 5.3. As amostras seqüenciadas neste trabalho foram alinhadas com as seqüências genômicas de outras vacinas de sarampo, já citadas acima, para a construção da árvore. Podemos observar que as amostras VSF-3, VSF-10 e FMS-7 formam um ramo distinto da árvore, distante filogeneticamente dos outros ramos formados pelas vacinas originadas do isolado Edmonston. As cepas vacinais Moraten e Schwarz possuem seqüências exatamente iguais, mesmo tendo histórico de passagens diferentes, e formam um único ramo. A cepa Rubeovax, também derivada da

Edmonston aparece como um ancestral de Moraten e Schwarz. As cepas AIK-C e Edmonston-Zagreb aparecem no mesmo ramo próximas à Changchun-47, vacina não derivada da Edmonston. Como esperado, a cepa Edmonston selvagem aparece como ancestral comum de todas as cepas vacinais. A cepa referência MeV-IchinoseB95a, pertencente ao genótipo D, foi usada como grupo de fora.

Tabela 5.3. Comparação dos genomas completos da cepa Edmonston selvagem e de cepas vacinais do vírus do sarampo.

Pos nt	Pos AA	Ed wt	CAM	AIK	Mor	Sch	EZ	Rub	C47	AA
26	-	A	T	T	T	T	T	T	T	-
42	-	A	C	C	C	C	T	C	C	-
96	-	G	•	•	•	•	A	•	•	-
275	N56	C	•	•	G	G	•	•	•	V
280	N58	T	C	•	•	•	•	•	•	L→S
449	N114	T	A	•	•	•	•	•	•	L
492	N129	C	•	A	•	•	•	•	•	Q→K
548	N147	C	•	•	•	•	•	•	T	F
550	N148	A	•	•	G	G	•	•	•	E→G
623	N172	C	•	•	•	•	T	•	•	A
722	N205	A	•	•	•	•	•	G	•	V
903	N266	T	C	•	•	•	•	•	•	L
998	N297	G	A	•	•	•	•	•	•	E
1214	N369	A	G	•	•	•	•	•	•	V
1408	N434	G	C	•	•	•	•	•	•	G→A
1528	N474	A	•	•	•	•	•	•	C	D→A
1542	N479	T	•	•	A	A	•	A	•	S→T
1702	-	A	G	•	G	G	•	G	•	-
1724	-	C	•	•	A	A	•	•	•	-
1806	-	G	A	•	A	A	•	A	•	-
1866	P20	G	A	•	•	•	•	•	•	K
2046	P80	C	T	T	T	T	T	T	T	G
2098	P98	A	G	•	•	•	•	•	•	G→R
2101	P99	A	G	•	•	•	•	•	•	D→N
2134	P110	T	•	•	•	•	•	•	C	Y→H
2135	P110	A	G	•	•	•	•	•	•	Y→C
2139	P111	T	•	•	C	C	•	C	•	Y
2167	P121	A	G	•	•	•	•	•	•	K→E
2194	P130	A	G	•	•	•	•	•	•	M→V
2219	P138	A	G	•	•	•	•	•	•	D→G
2222	P139	G	•	•	•	•	•	•	A	S→N
2229	P141	C	•	A	•	•	•	•	•	L
2299	P165	A	G	•	•	•	•	•	•	I→V
2451	P215	C	•	•	•	•	T	•	•	P
2480	P225	A	G	G	G	G	G	G	G	E→G
2603	P266	G	C	•	•	•	•	•	•	G→A
2630	P275	G	•	A	•	•	•	•	•	C→Y
2659	P285	T	C	•	•	•	•	•	•	W→R
2709	P301	A	G	•	•	•	•	•	•	E
2710	P302	G	•	•	•	•	•	•	A	E→K
3061	P419	C	A	•	•	•	•	•	•	L→I
3122	P439	T	•	C	•	•	•	•	•	L→P
1866	C13	G	A	•	•	•	•	•	•	R→K
2046	C73	C	T	T	T	T	T	T	T	A→V
2098	C90	A	G	•	•	•	•	•	•	Q
2101	C91	A	G	•	•	•	•	•	•	E
2134	C102	T	•	•	•	•	•	•	C	V
2135	C103	A	G	•	•	•	•	•	•	I→V
2139	C104	T	•	•	C	C	•	C	•	M→T
2167	C113	A	G	•	•	•	•	•	•	L
2194	C122	A	G	•	•	•	•	•	•	S
2219	C131	A	G	•	•	•	•	•	•	I→V
2222	C132	G	•	•	•	•	•	•	A	A→T

As cepas vacinais estão identificadas, com seus respectivos números de acesso ao GenBank: Ed wt = Edmonston selvagem (AF266288); CAM = CAM-70: (DQ345721); as cepas Sch = Schwarz (AF266291) e Moraten (AF266287) partilham seqüências genômicas idênticas; AIK = AIK-C (AF266286); EZ = Edmonston-Zagreb (AY486084); Rub = Rubeovax (AF266289); C47 = Changchun-47 (AF128250). Abreviações: Pos nt = posição nucleotídica; Pos AA = posição de aminoácido; AA = aminoácidos apresentados como símbolos de letra única. Sombreados representam mudanças comuns a todas as vacinas. Letras em negrito representam alterações nucleotídicas exclusivas para vacina CAM-70. * Heterogeneidades para CAM-70; nucleotídeos em maiúscula representam a população majoritária.

Nt pos	AA pos	Ed wt	CAM	AIK	Mor	Sch	EZ	Rub	C47	AA
2229	C134	C	•	A	•	•	•	•	•	S→Y
2299	C157	A	G	•	•	•	•	•	•	L
1866	V20	G	A	•	•	•	•	•	•	K
2046	V80	C	T	T	T	T	T	T	T	G
2098	V98	A	G	•	•	•	•	•	•	R→G
2101	V99	A	G	•	•	•	•	•	•	N→D
2134	V110	T	•	•	•	•	•	•	C	Y→H
2135	V110	A	G	•	•	•	•	•	•	Y→C
2139	V111	T	•	•	C	C	•	C	•	Y
2167	V121	A	G	•	•	•	•	•	•	K→E
2194	V130	A	G	•	•	•	•	•	•	M→V
2219	V138	A	G	•	•	•	•	•	•	D→G
2222	V139	G	•	•	•	•	•	•	A	S→N
2229	V141	C	•	A	•	•	•	•	•	L
2299	V165	A	G	•	•	•	•	•	•	I→V
2451	V215	C	•	•	•	•	T	•	•	P
2480	V225	A	G	G	G	G	G	G	G	E→G
2603	V266	G	C	•	•	•	•	•	•	R→S
2629	V275	G	•	A	•	•	•	•	•	V
2659	V285	T	C	•	•	•	•	•	•	V→A
3431	-	T	•	•	G	G	•	•	•	-
3448	M4	T	•	•	C	C	•	C	•	I→T
3487	M17	C	•	•	•	•	T	•	•	S→L
3506	M23	C	•	G	•	•	•	•	•	P
3598	M54	T	•	C	•	•	•	•	•	F→S
3619	M61	G	A	A	A	A	A	A	A	D→G
3627	M64	C	T	•	T	T	•	T	•	P→S
3661	M75	C	•	•	T	T	•	•	•	S→F
3702	M89	G	A	A	A	A	A	A	A	E→K
3868	M144	T	•	•	•	•	•	•	C	V→A
3889	M151	C	•	•	•	•	•	•	A	T→N
3968	M177	G	A	•	•	•	•	•	•	M→I
4013	M192	G	•	•	•	•	•	•	A	V
4111	M225	G	T	•	•	•	•	•	•	R→M
4118	M227	G	T	•	•	•	•	•	•	K→N
4292	M285	G	A	•	•	•	A	•	•	I→M
4515	-	G	•	•	•	•	•	•	A	-
4536	-	G	•	T	•	•	•	•	•	-
4574	-	G	•	A	•	•	•	•	•	-
4608	-	T	•	•	•	•	•	C	C	-
4611	-	C	•	T	•	•	T	•	•	-
4742	-	T	•	•	•	•	•	•	C	-
4763	-	T	•	•	•	•	•	•	C	-
4925	-	G	•	•	•	•	•	•	T	-
4978	-	T	C	C	C	C	C	C	C	-
5030	-	C	•	T	•	•	•	•	•	-
5180 [†]	-	T	T/c	•	•	•	•	•	•	-
5187 [‡]	-	T	T/c	•	•	•	•	•	•	-
5308	-	T	•	•	•	•	•	C	•	-
5348	-	T	•	•	•	•	C	•	•	-
5349	-	T	C	C	C	C	C	C	C	-
5402	-	C	T	•	•	•	•	•	•	-
5427	-	T	C	•	•	•	•	•	•	-
5514	F19	G	A	A	A	A	A	A	A	Q
5613	F52	A	C	•	•	•	•	•	•	Q→H
5776	F107	A	G	•	•	•	•	•	•	S→G
5944	F163	G	•	•	A	A	•	•	•	A→T
5950	F165	A	G	•	•	•	•	•	•	R→G
5956	F167	G	•	•	•	•	•	•	T	A→S
6102	F215	A	G	•	•	•	•	•	•	S
6117	F220	C	•	•	T	T	•	T	•	S
6244	F263	A	•	•	G	G	•	G	•	R→G
6475	F340	G	•	•	•	•	•	•	A	G→R
6542	F362	C	T	A	A	A	•	A	•	S→Y→F
6649	F398	T	C	•	•	•	•	•	•	Y→H
6707	F417	C	A	•	•	•	•	•	•	A→D
6712	F419	C	•	A	•	•	•	•	•	H→N
6743	F429	C	•	•	•	•	•	T	•	T→I

Nt pos	AA pos	Ed wt	CAM	AIK	Mor	Sch	EZ	Rub	C47	AA
6774	F439	C	•	•	•	•	T	•	•	D
6815	F453	C	•	T	•	•	•	•	•	S→L
6937	F494	A	•	T	•	•	•	•	•	S→C
7143	-	C	G	•	•	•	•	•	•	-
7243	-	T	•	•	C	C	•	•	•	-
7407	H46	C	T	T	T	T	T	T	T	S→F
7544	H92	C	•	•	•	•	•	•	T	L
7548	H93	C	T	•	•	•	•	•	•	T→I
7621	H117	C	•	•	A	A	•	•	•	F→L
7669	H133	C	•	•	•	•	•	•	A	F→L
7740	H157	T	C	•	•	•	•	•	•	V→A
7794	H175	G	A	•	•	•	•	•	•	R→K
7901	H211	A	G	G	G	G	G	G	G	S→G
8109	H280	T	•	•	•	•	C	•	•	V→A
8174	H302	G	•	C	•	•	•	•	•	G→R
8282	H338	C	T	A	•	•	•	•	•	P→T→S
8634	H455	C	A	•	•	•	•	•	•	T→N
8641	H457	G	•	A	•	•	•	•	•	P
8707	H479	T	C	•	•	•	•	•	•	S
8711	H481	A	T	T	T	T	T	T	T	Y→N
8721	H484	C	•	A	•	•	A	•	A	T→N
8784	H505	A	G	•	•	•	•	•	•	D→G
8906	H546	G	A	A	A	A	•	A	A	S→G
8918	H550	T	•	•	•	•	•	•	G	S→A
9045	H592	G	A	•	•	•	•	•	•	G→E
9078	H603	G	A	•	•	•	•	•	•	G→E
9139	-	C	•	T	•	•	•	•	•	-
9144	-	A	•	T	•	•	T	•	T	-
9846	L204	A	G	•	•	•	•	•	•	I→V
9874	L213	G	A	•	•	•	•	•	•	S→N
9936	L234	A	G	•	•	•	•	•	•	I→N
10225	L330	T	•	•	C	C	•	•	•	I→T
10555	L440	A	•	•	•	•	G	•	•	K→R
10771	L512	T	•	•	•	•	•	•	C	V→A
11306	L690	A	•	•	•	•	•	•	C	S
11401	L722	A	C	•	•	•	•	•	•	Y→S
11999	L922	A	•	•	•	•	G	•	•	T
12308	L1025	T	•	•	•	•	•	•	C	S
12486	L1084	C	T	•	T	T	•	T	•	L
12505	L1090	G	A	•	•	•	•	•	•	R→K
12506	L1090	G	A	•	•	•	•	•	•	R→K
12521	L1095	C	•	•	•	•	•	•	A	T
12600	L1123	A	•	•	•	•	•	C	•	R
13247	L1338	T	C	•	•	•	•	•	•	L
13458	L1408	G	•	A	•	•	A	•	A	T→A
14066	L1611	C	T	•	•	•	•	•	•	H
14103	L1623	A	•	G	•	•	•	•	•	T→A
14179	L1648	G	T	•	T	T	•	T	•	M→R
14383	L1717	A	C	C	C	C	C	C	C	D→A
14579	L1782	A	G	G	G	G	G	G	G	E
14612	L1792	T	•	•	•	•	C	•	•	S
14630	L1798	G	•	•	A	A	•	•	•	K
14892	L1886	A	G	•	G	G	•	G	•	D→N
15038	L1934	T	•	•	•	•	C	•	•	S
15039	L1935	C	•	T	•	•	•	•	•	H→Y
15086	L1950	A	•	•	C	C	•	C	•	I
15454	L2073	A	•	G	•	•	•	•	•	Q→R
15542	L2102	T	•	•	C	C	•	C	•	F
15574	L2113	G	•	•	A	A	•	•	•	R→K
15704	L2156	T	•	•	•	•	•	•	C	R
15789	-	G	•	A	•	•	•	•	•	-
15795	-	C	T	•	•	•	•	•	•	-
15843	-	T	•	•	•	•	G	•	•	-

Tabela 5.4. Comparação das cepas vacinais do vírus do sarampo em termos de substituição de nucleotídeos e de aminoácidos, em relação ao vírus Edmonston selvagem.

Regiões ¹	Cepas vacinais ²						
	CAM	Sch	AIK	EZ	Rub	C47	VAC
3' - líder	2	2	2	3	2	2	2
N	6/2	3/2	1/1	1/0	2/1	2/1	0/0
<N-P>	2	3	0	0	2	0	0
P/V/C	14/25	3/4	5/6	3/3	3/4	5/9	2/3
<P-M>	0	1	0	0	0	0	0
M	7/7	5/5	4/3	4/4	4/4	5/4	2/2
<M-F>	4	2	6	4	4	7	2
F	8/6	5/3	5/4	2/0	5/3	3/2	2/1
<F-H>	1	1	0	0	0	0	1
H	13/12	5/5	8/7	5/5	4/4	8/7	4/4
<H-L>	0	0	2	1	0	1	0
L	13/8	10/5	6/5	7/3	8/3	8/3	2/1
5' - trailer	1	0	1	1	0	0	0
Total*	71/60	40/24	40/26	31/15	35/19	41/26	15/10
Similaridade (%)	99.55%	99.75%	99.75%	99.8%	99.78%	99.74%	-

¹ As regiões do genoma estão identificadas em ordem seqüencial, incluindo as regiões intergênicas.

² As cepas vacinais estão identificadas como se segue, com seus respectivos números de acesso ao GenBank: CAM = CAM-70: DQ345721; as cepas Sch = Schwarz (AF266291) e Moraten (AF266287) partilham seqüências genômicas idênticas; AIK = AIK-C: AF266286; EZ = Edmonston-Zagreb: AY486084; Rub = Rubeovax: AF266289; C47 = Changchun-47: AF128250; VAC = mudanças comuns a todas as vacinas; *os valores numéricos estão apresentados como o número de alterações nucleotídicas seguidos pelo número de trocas de aminoácidos em cada região do genoma.

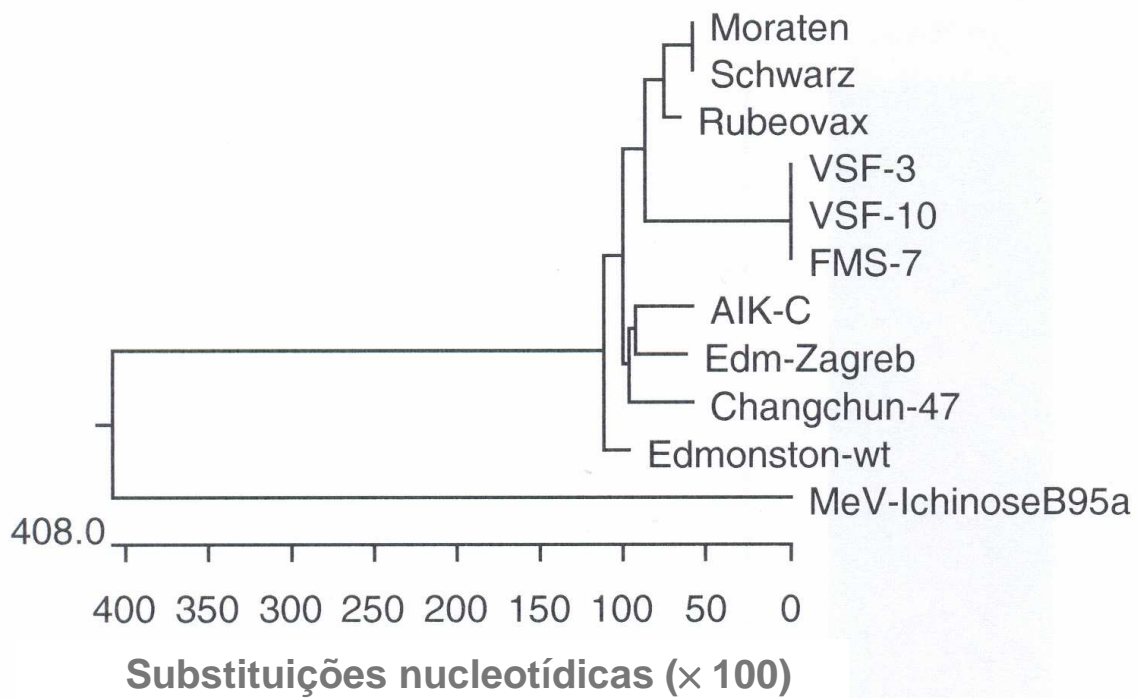


Figura 5.3. Esquema da árvore filogenética do genoma completo de cepas vacinais do vírus do sarampo, incluindo as três passagens do vírus CAM-70 e a cepa protótipo Edmonston selvagem. A cepa referência MeV-IchinoseB95a, pertencente ao genótipo D, foi usada como grupo de fora. Números de acesso ao GenBank: Edmonston wt = Edmonston selvagem: AF266288; três níveis de passagem da cepa CAM-70, VSF-3: DQ345721; FMS-7: DQ345722; VSF-10: DQ345723; Schwarz (AF266291) e Moraten (AF266287) partilham seqüências genômicas idênticas; AIK-C: AF266286; Edm-Zagreb = Edmonston-Zagreb: AY486084; Rubeovax: AF266289; Changchun-47: AF128250; MeV-IchinoseB95a: NC001498.

5.3 Titulação do interferon em fibroblastos de embrião de galinha

Culturas de CEF cultivadas em alta densidade (AD) e baixa densidade (BD) e inoculadas com o vírus CAM-70 foram coletadas diariamente por um período de 10 ou 15 dias. Durante o acompanhamento da cinética, as culturas eram observadas diariamente para verificação do aparecimento de efeito citopático. Em todos os experimentos, foi possível observar CPE apenas nas culturas em BD.

A capacidade do vírus do sarampo, cepa vacinal CAM-70 de induzir IFN nestas culturas foi testada através de um ensaio que utiliza o vírus Sindbis como desafio. Este vírus, por ser comprovadamente sensível ao IFN, mesmo quando inoculado em MOI elevada (Weigent *et al*, 1981), é utilizado como uma evidência indireta da presença do IFN nas culturas.

A figura 5.4 apresenta um exemplo do experimento realizado para dosagem de IFN com o vírus Sindbis em AD. Observa-se que nos orifícios aos quais foi adicionada a suspensão de cultura de CEF infectada com CAM-70, o efeito citopático (CPE) de Sindbis foi inibido. O CPE de Sindbis apresenta uma relação inversa à D.O. medida, ou seja, quanto maior a D.O. maior o número de células preservadas e maior o título de IFN obtido no sobrenadante. A figura 5.5 apresenta os gráficos mostrando a cinética de redução de CPE do vírus Sindbis, cultivado na presença de suspensão das culturas em AD e BD infectadas com o vírus CAM-70, estudadas por um período de 10 ou 15 dias. O efeito inibitório da suspensão das culturas de CEF em AD infectadas com CAM-70 na replicação do vírus Sindbis ocorreu nos três experimentos enquanto que nas culturas em BD, não houve detecção de inibição. Nas curvas de titulação de IFN constatamos que nas culturas em BD, para os três experimentos, o título de IFN foi inferior ao limite de detecção do teste (diluição 1:8 ou $0,9 \log_{10}$). Nas culturas em AD os maiores títulos obtidos foram: experimento 1 = 1:512,8; experimento 2 = 1:138 e experimento 3 = 1:123. Estes valores representam uma diferença de título em relação às culturas em BD de cerca de: 64× (experimento 1); 17× (experimento 2), 15× (experimento 3).

As suspensões virais provenientes das culturas em AD e BD também foram tituladas em células Vero para a quantificação do título viral. Nos três experimentos, os títulos mais altos foram obtidos nas culturas em BD. Nas curvas de titulação viral, avaliando a diferença entre os maiores títulos obtidos para AD e BD em cada experimento verificamos: No experimento 1, $0,7 \log_{10}$ PFU/ml; no experimento 2, $0,93 \log_{10}$ PFU/ml e no experimento 3, $0,75 \log_{10}$ PFU/ml.

Diluições seriadas dos sobrenadantes das culturas infectadas com o vírus do sarampo

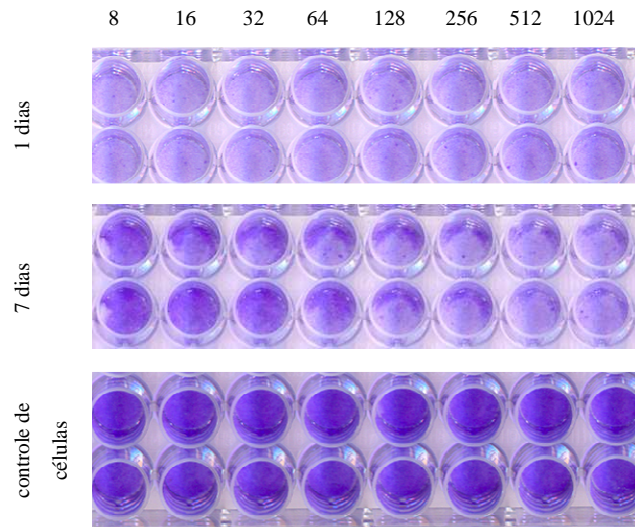


Figura 5.4 – Cinética de redução de efeito citopático do vírus Sindbis, cultivado na presença do sobrenadante das culturas de fibroblastos de embrião de galinha em alta densidade, infectadas com o vírus do sarampo, cepa vacinal CAM-70. As linhas mostram os dias pós-infecção (pi) e as colunas representam as diluições seriadas dos sobrenadantes. Esta figura representa duplicatas de dois entre os dias testados no experimento e do controle de células.

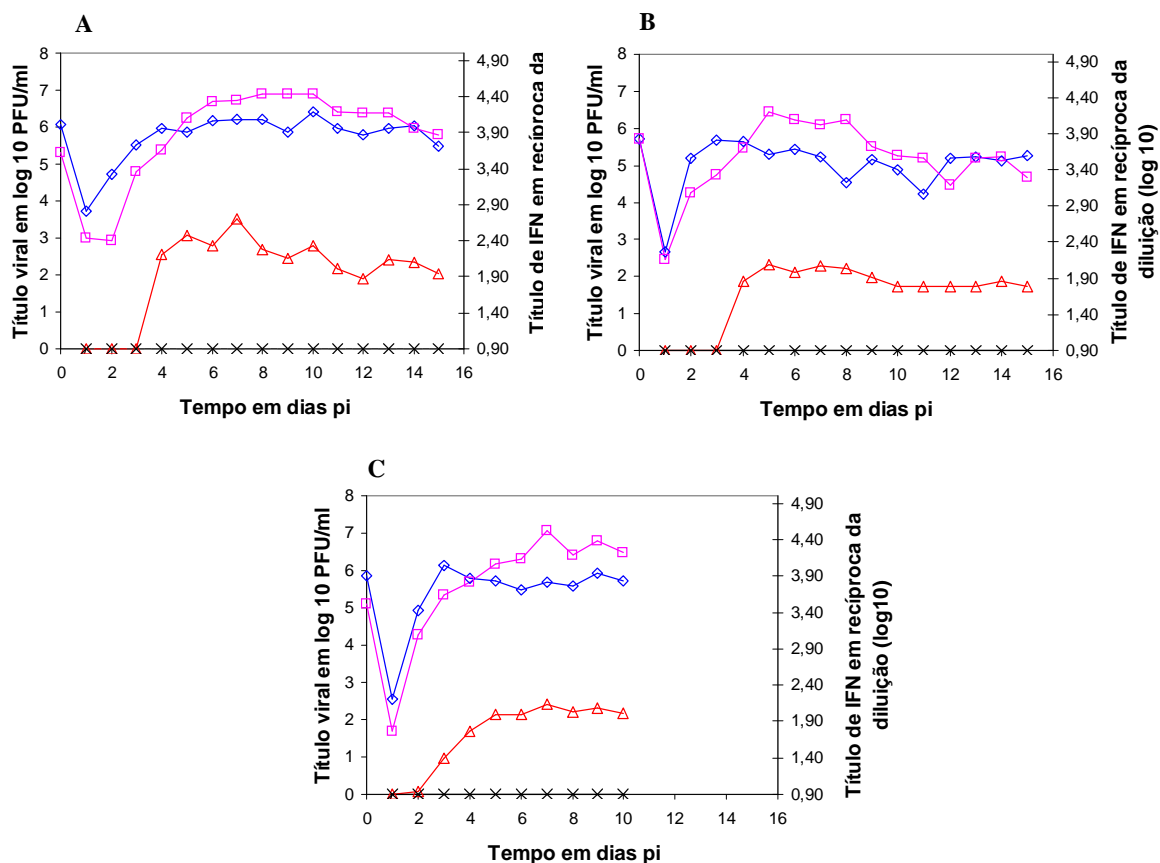


Figura 5.5. Gráficos da cinética de produção de interferon e de replicação de CAM-70 em culturas de fibroblastos de embrião de galinha (CEF) ao longo de 10 ou 15 dias com diferentes multiplicidades de infecção (MOI). -◇- título viral obtido em culturas em AD; - - título viral obtido em culturas em BD; -△- título de interferon obtido em culturas em AD; -×- título de interferon em obtido em culturas em BD. O título viral está expresso em log₁₀ PFU/ml; o título de interferon está expresso em log₁₀ da recíproca da diluição; o tempo está expresso em dias pós-infecção (pi). Densidade celular para AD = 6×10⁵ células/cm²; densidade celular para BD = 1×10⁵ células/cm². **A.** Gráfico representando o experimento 1, MOI = 0,08 **B.** Experimento 2, o *input* viral foi igual para as duas densidades celulares; MOI AD = 0,022; MOI BD = 0,132 **C.** Experimento 3, MOI = 0,05; este experimento foi acompanhado por 10 dias.

5.4 Detecção da expressão do gene de 2-5 oligoadenilatosintetase (2-5 OAS) induzido por CAM-70 em fibroblastos de embrião de galinha

Os resultados obtidos na titulação de IFN levaram a crer que o IFN fosse, realmente, a causa da interferência na replicação do vírus CAM-70 cultivado em culturas de CEF. Para confirmar este resultado, a expressão de 2-5OAS ativada por IFN, foi analisada por RT-PCR usando como controle negativo culturas não-infectadas. O gene constitutivo da β -actina foi usado em cada reação de RT-PCR com o objetivo de verificar se as diferenças encontradas entre os dias de coleta eram devido a diferenças na expressão gênica ou a diferenças nas quantidades de RNA analisado. Os baixos rendimentos de RNA não permitiram a detecção de 2-5OAS nas culturas em BD, portanto só as culturas em AD puderam ser avaliadas quanto à expressão deste gene (dados não mostrados). O material analisado neste teste foi o do experimento 3. Na figura 5.6 pode ser observada a expressão de 2-5OAS, somente nas culturas infectadas, ao longo de 10 dias de coleta. Apesar de haver, aparentemente, diferenças em relação aos dias de coleta, a interpretação dos resultados de 2-5OAS em comparação com os de β -actina, demonstra que os níveis de expressão são equivalentes e contínuos ao longo do tempo de observação. Correlacionando este resultado com a curva de titulação de IFN do experimento 3 (Figura 5.5C), podemos ver que o título de IFN começa a ser detectado a partir do terceiro dia de coleta e atinge o título máximo no quinto dia, ao passo que a expressão de 2-5OAS pode ser detectada desde o primeiro dia de coleta e permanece contínua até o final do experimento.

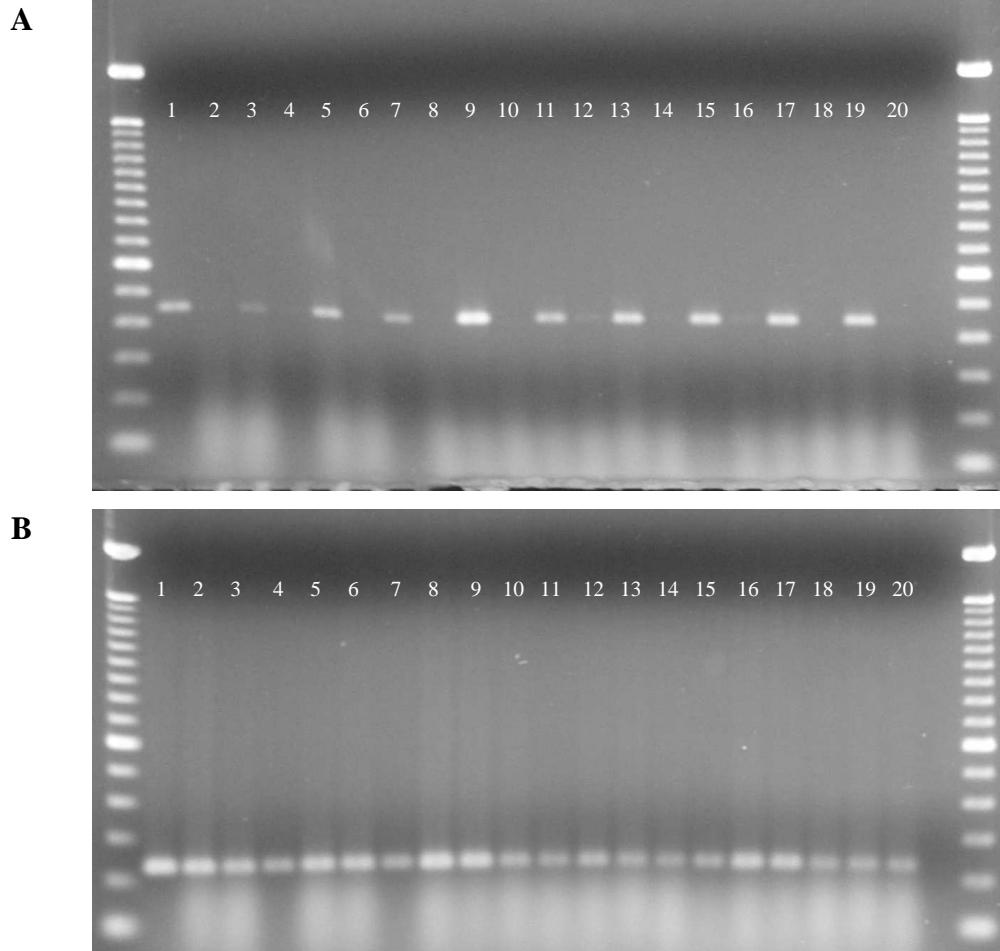


Figura 5.6 – Transcrição reversa seguida de amplificação por cadeia de polimerase (RT-PCR) para detecção da expressão de 2-5OAS em culturas de fibroblasto de embrião de galinha (CEF) infectadas com o vírus do sarampo cepa CAM-70 em cinética de replicação viral de 10 dias. Os géis correspondem a: **A.** 2-5OAS; **B.** β -actina. As colunas correspondem a: **1)** 1 dia infectada; **2)** 1 dia controle; **3)** 2 dias infectada; **4)** 2 dias controle; **5)** 3 dias infectadas; **6)** 3 dias controle; **7)** 4 dias infectada; **8)** 4 dias controle; **9)** 5 dias infectada; **10)** 5 dias controle; **11)** 6 dias infectada; **12)** 6 dias controle; **13)** 7 dias infectada; **14)** 7 dias controle; **15)** 8 dias infectada; **16)** 8 dias controle; **17)** 9 dias infectada; **18)** 9 dias controle; **19)** 10 dias infectada; **20)** 10 dias controle.

6. DISCUSSÃO

6.1 Estabilidade genômica do vírus do sarampo cepa vacinal CAM-70 ao longo de passagens em fibroblastos de embrião de galinha

O vírus do sarampo é monotípico e geneticamente caracterizado em oito clades (A-H), divididas em 22 genótipos reconhecidos (WHO, 2003). Todas as vacinas contra o sarampo, independente da diversidade de sua origem ou das diferenças no processo de atenuação, estão classificadas na clade A. Análises anteriores, no entanto, classificaram a vacina CAM-70 como o membro mais divergente de sua clade (Rota *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 2003). No presente estudo pesquisamos a estabilidade genética da cepa vacinal CAM-70 após passagens seriadas. O seqüenciamento nucleotídico dos vírus nos três diferentes níveis de passagem analisados revelou seqüências nucleotídicas idênticas. Duas heterogeneidades encontradas nas posições 5180 e 5187 do genoma de FMS-7, também foram observadas na terceira e na décima passagem. Estas heterogeneidades estão localizadas no espaço intergênico entre os genes M e F. Regiões intergênicas contêm elementos que atuam em cis e que estão envolvidos no controle da expressão gênica e na replicação do genoma viral. Parks e colaboradores (2001) investigaram a presença de marcadores de atenuação dentro destas regiões. Nelas, foram identificadas 21 posições onde havia uma ou mais diferenças entre a cepa Edmonston selvagem e as cinco cepas vacinais estudadas. A razão pela qual as mutações do vírus do sarampo se acumulam nas potenciais seqüências que atuam em cis dentro das regiões não traduzidas é meramente especulativa. Entretanto, parece razoável sugerir que pelo menos algumas destas mutações conferem uma vantagem seletiva para a replicação viral sob as condições usadas no processo de atenuação dos vírus vacinais (Parks *et al.*, 2001). As heterogeneidades nucleotídicas encontradas no genoma dos vírus analisados em nosso estudo não estão relacionadas com os potenciais determinantes de atenuação descritos por Parks. Takeda e colaboradores (2005), através do uso de genética reversa, sugeriram um papel no controle da replicação e na citopatogenicidade para a região não-traduzida entre os genes M e F. De acordo com alguns autores, alterações nucleotídicas nesta região são esperadas e não teriam uma influência significativa na virulência, uma vez que esta região é capaz de acumular e tolerar tais alterações (Heider *et al.*, 1997; Santak *et al.*, 2007). Embora o processo de atenuação da CAM-70 tenha incluído uma etapa de purificação de placas de lise, a presença e preservação das heterogeneidades pode ter fornecido vantagens replicativas adquiridas no processo de fabricação da vacina, como já foi descrito para a vacina de febre

amarela (Pugachev *et al.*, 2002). A presença de heterogeneidades em seqüências genômicas de vírus do sarampo nunca haviam sido descritas e por esta razão a discussão deste tópico torna-se restrita. No entanto, é importante enfatizar a limitação da análise genômica por seqüenciamento direto, que só é capaz de detectar mutações presentes em concentrações superiores a 10-20% (Galler *et al.*, 2001; Pugachev *et al.*, 2004).

Identificamos três diferenças nucleotídicas no gene H em comparação com a seqüência de CAM-70 estudada por Rota e colaboradores (1994) e duas diferenças no gene P em comparação com a seqüência estudada por Santos e colaboradores (2003) (Tabela 5.1). De fato, ambos os estudos efetuaram algumas passagens em células Vero para obtenção de estoque para produção de RNA e seqüenciaram fragmentos clonados de cDNA ao invés de produtos de RT-PCR. Recentemente, foi descrito que passagens em células Vero alteraram as características da vacina contra o sarampo cepa AIK-C, especialmente em relação ao fenótipo de placas e de replicação. A cepa vacinal AIK-C é derivada da cepa Edmonston e também é produzida em CEF. Sua propagação em cultura de células Vero pode levar a alterações no genoma que refletem as adaptações à célula hospedeira (Uejima *et al.*, 2006). Ademais, produtos de RT-PCR representam a maioria dos genomas virais e seu uso para seqüenciamento não revela uma minoria populacional que possa surgir durante a passagem em Vero. Em células infectadas podem surgir variantes virais, mas normalmente a grande maioria, se não todos eles, serão mantidos a baixas freqüências por seleção negativa. Este fato é especialmente verdadeiro para vírus RNA passados diversas vezes em cultivo celular sob condições definidas (Domingo *et al.*, 1994). Esta observação pode ser confirmada no estudo de Baricevic e colaboradores (2004), onde foram comparadas as seqüências genômicas do vírus semente da vacina Edmonston-Zagreb e do vírus de trabalho, que passa por passagens adicionais. Os resultados obtidos confirmaram que as duas seqüências não diferem ao nível molecular.

6.2 Estudo de variantes virais através de seleção de placas de lise

A atenuação do vacina do sarampo cepa CAM-70 passou por uma etapa de purificação de placas de lise, entretanto, uma vez que vírus RNA possuem uma natureza de *quasispecies* (Domingo *et al.*, 1994), esperávamos encontrar variantes virais através da seleção de placas de lise. Embora tenhamos tentado manter as condições do plaqueamento semelhantes às condições das passagens, o vírus não foi capaz de plaquear a 30°C e para formação de placas de lise, os ensaios tiveram que ser conduzidos a 37°C. O motivo pelo qual os vírus não formaram placas de lise a 30°C não está claro. Quinze placas de lise foram coletadas,

ressuspensas em meio de crescimento e passadas uma vez em culturas de CEF. Os vírus obtidos foram titulados em células Vero e testados por PCR (Tabela 5.2). A seqüência dos 450 nucleotídeos da porção C-terminal do gene N é uma das regiões mais variáveis do genoma e, nela, a variabilidade entre amostras selvagens pode chegar a 12%. Esta região exclusiva ou juntamente com todo o gene H é usada para genotipagem (Xu *et al.*, 1998; WHO, 2003). Sete das placas de lise selecionadas foram positivas por PCR e seqüenciadas nesta região (Tabela 5.2). Dentre elas, somente uma seqüência apresentou uma única heterogeneidade em relação a FMS-7, não causando, no entanto, alteração de aminoácido. Embora a temperatura de incubação possa refletir na adaptabilidade da população viral, não está claro se esta heterogeneidade pode ter ocorrido advinda de alterações de temperatura. Estudos anteriores sugeriram que o vírus do sarampo possui taxa de mutação similar à de outros vírus RNA (Schrag *et al.*, 1999). Entretanto, estudos epidemiológicos ressaltaram que o vírus do sarampo demonstra estabilidade genética acentuada no campo. Foi observada pouca variação nucleotídica em isolados pertencentes a uma cadeia de transmissão comum bem como em isolados pertencentes ao mesmo genótipo, mas coletados em ocasiões diferentes (Rota *et al.*, 1996; Rima *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2002). As estimativas de taxas de mutação levam a crer que os vários genótipos atualmente em circulação no mundo refletem variações duradouras do vírus do sarampo. Este estudo demonstra que a vacina do sarampo cepa CAM-70 está altamente adaptada às condições de cultivo e que é extremamente estável do ponto de vista genético. Uma vez que os protocolos de produção limitam a três, o número de passagens do vírus semente, a segurança desta vacina está garantida, desde que sejam mantidos os parâmetros até hoje utilizados. Entretanto, a possibilidade de realizar sete passagens adicionais mantendo a estabilidade genética do vírus nos permite aumentar a capacidade de produção em quantidades, praticamente, inesgotáveis.

6.3 Capacidade de indução de interferon em fibroblastos de embrião de galinha pelo vírus CAM-70 e sua sensibilidade ao interferon

A pesquisa em citocinas de aves foi iniciada com a descoberta de um fator, que interferia com a replicação do vírus da influenza em membranas córioalantóides de embriões de galinha, denominado IFN (Isaacs & Lindenmann, 1957). Entretanto, só a partir de 1994 as características moleculares dos IFNs de aves passaram a ser investigadas (Sekellick *et al.*, 1994), apesar da maioria dos IFNs de mamíferos já virem sendo detalhadamente estudados, há muito mais tempo.

Estratégias de clonagem permitiram a identificação de um cDNA de galinha com um pequeno grau de homologia com o cDNA de mamíferos para IFNs do tipo I. Entretanto, características da proteína por ele codificada, como um padrão conservado de cisteína, levaram ao reconhecimento do que foi chamado ChIFN- α (Sick *et al.*, 1996; Schultz *et al.*, 2004). A busca por novos genes de ChIFN resultaram na identificação de um conjunto de cerca de 10 genes sem introns para IFN- α e de um único gene para IFN- β , todos localizados no braço curto do cromossomo Z (Nanda *et al.*, 1998). Os vários subtipos de IFN- α diferem entre si apenas por alguns aminoácidos. Por outro lado, o IFN- β partilha somente 57% de identidade com o IFN- α , e sua atividade antiviral não é neutralizada por anticorpos anti-ChIFN- α . Apesar da atividade antiviral específica do IFN- β purificado ser 10 vezes inferior à do IFN- α , ensaios recentes demonstraram que IFN- α e IFN- β são igualmente ativos, sugerindo que ambos possuem funções biológicas distintas (Schumacher *et al.* 1994; Schultz *et al.* 2004). Originalmente, os IFNs- α eram denominados ChIFN1 e o IFN- β era denominado ChIFN2, mas a nomenclatura α/β foi adotada com base na alta similaridades das estruturas promotoras e nas respostas diferenciais a agentes indutores virais e não-virais entre os subtipos de IFN do tipo I de mamíferos e galinha (Sick *et al.*, 1998; Lowenthal *et al.*, 2001).

O estudo de indução de IFN pelo vírus CAM-70 e a sensibilidade deste vírus ao IFN foram realizados neste trabalho utilizando CEF como substrato. A avaliação da influência do IFN na replicação dos vírus vacinais em CEF é essencial para a otimização de parâmetros de produção de vacinas. Um dos parâmetros observados na produção da vacina é o efeito citopático produzido durante o cultivo de vírus. Ao contrário das culturas em BD, as culturas em AD permaneceram intactas, sem aparecimento de efeito citopático, sugerindo proteção celular conferida pelas proteínas produzidas através da indução do IFN. Para avaliar a capacidade de indução de interferon do vírus CAM-70 em CEF, realizamos um ensaio para detecção de interferons baseado na redução do efeito citopático de um vírus desafio, adaptado de Rubinstein e colaboradores (1981). Neste ensaio, os sobrenadantes de culturas de CEF inoculadas com o vírus CAM-70, são previamente tratados a 56°C por 1 h. Este procedimento inativa o vírus do sarampo, mas não inativa os interferons (Isaacs & Lindenmann, 1957). Os sobrenadantes diluídos são transferidos para CEF cultivada em microplacas. As culturas são incubadas por 24 na presença dos sobrenadantes, que supostamente contêm interferon, e então desafiadas com o vírus Sindbis. Este vírus é indicado como desafio pela sua reconhecida sensibilidade ao interferon, por replicar eficientemente em diversos tipos celulares e também por reter a sensibilidade ao interferon, mesmo quando inoculado em multiplicidades de infecção elevadas (Lloyd *et al.*, 1983). Os resultados são interpretados como a diluição onde

há redução de 50% do efeito citopático provocado pelo vírus desafio. Foi possível evidenciar, através deste ensaio, a presença de um fator nos sobrenadantes de culturas de CEF cultivadas em AD e inoculadas com o CAM-70, que protegia as células contra o vírus Sindbis. Nas culturas em BD, este fato não foi observado. De fato nos três experimentos de titulação de IFN realizados os títulos virais obtidos nas culturas em BD foi superior aos das culturas em AD, sugerindo que a ação do IFN pudesse estar contribuindo para diminuir a eficiência da replicação viral. O pré-tratamento de culturas de células com interferon promove o aumento nos níveis do interferon produzido por estas culturas em resposta a um agente indutor produzindo um estado anti-viral (steady-state). Este fenômeno complexo é denominado “priming” e pode alterar, quantitativa e qualitativamente, a transdução de sinal induzida por IFNs do tipo I (Stewart, 1971; van Boxel-Dezaire *et al.*, 2006). Nossos resultados indicam que o fator secretado pelas culturas corresponde a IFN I. A possível explicação para que este fator não esteja presente nas culturas em BD é de que, pelo fato de haver seis vezes menos células nas culturas em BD, ele seja secretado em menores concentrações e não seja detectado. De fato, experimentos similares realizados com o vírus da febre amarela cepa 17DD em nosso laboratório demonstraram que incrementos na densidade celular viabilizam a detecção de IFN. Freire (2004) identificou o IFN como sendo o fator responsável por baixos rendimentos do vírus 17DD obtido em culturas de CEF em AD, com diferenças de título de até 2,2 log₁₀ PFU/ml para os cultivos em BD. A indução de IFN em culturas infectadas pelo vírus do sarampo já foi demonstrada por diversos autores (Ho e Enders, 1959; Mirchamsy e Rapp, 1969; Volckaert-Vervliet e Billiau, 1977; Plumet *et al.*, 2007). No entanto, existem diferenças entre cepas distintas na capacidade de indução de IFN. Nanche e cols (2000) demonstraram que cepas atenuadas do vírus do sarampo induzem significativamente mais IFN α/β do que isolados selvagens provavelmente por que estes últimos suprimem ativamente a produção de IFN. Dez passagens destes vírus em células Vero foram suficientes para alterar seu fenótipo de supressores para indutores de IFN. Em 1969, Mirchamsy & Rapp já haviam observado que a cepa vacinal Schwarz induzia maiores quantidades de IFN em culturas de BSC-1 do que a cepa virulenta Edmonston. Células epiteliais infectadas com CAM-70 apresentaram uma inibição marcante na multiplicação celular e produziram quantidades extremamente pequenas de vírus (Yokota *et al.*, 2004). Nos nossos experimentos, os títulos virais obtidos alcançaram valores superiores em BD. Este resultado demonstra a capacidade do vírus CAM-70 de induzir interferon em CEF. A influência do IFN nos títulos da cepa CAM-70 em CEF não foi tão expressiva como foi para os títulos do vírus vacinal 17DD da febre amarela. Entretanto, os aumentos no rendimento viral observados nas culturas em BD infectadas com o vírus CAM-

70 passam a ser mais significativos quando extrapolados para uma escala industrial de produção de vacina.

6.4 Expressão de 2-5 OAS de *Gallus gallus* induzida por CAM-70

A replicação viral em vertebrados superiores é balizada pela ação dos IFNs que induzem a transcrição de genes que codificam para proteínas antivirais. O sistema 2'-5' oligoadenilato sintetase (OAS) humano faz parte destas proteínas e é codificado por três genes (OAS1 a OAS3), resultando em oito a 10 isoformas geradas por processamento alternativo de mRNA (Mashimo *et al.*, 2003). A OAS é ativada pela ligação a RNAs de dupla fita, resultantes da infecção viral. A OAS ativada cataliza a síntese, a partir do ATP, de 2'-5' oligoadenilatos, denominados 2-5 A [$p_x5'A(2'p5')_n$, onde $x = 1-3$ e $n \geq 2$]. Estes ácidos nucléicos incomuns se ligam à forma monomérica inativa da RNase L induzindo sua dimerização e ativação. A RNase L ativa cliva mRNA e rRNA presentes no citoplasma celular, levando à inibição da expressão protéica (Levy e García-Sastre, 2001; Malathi *et al.*, 2005). A única função conhecida para a 2-5A, até hoje, é se ligar e ativar a RNase L. Recentemente, determinou-se que a região do oligômero que interage com a RNase L é crítica e que somente oligômeros com mais de dois adenilatos são capazes de ativar a RNase L (Bisbal & Silverman, 2007).

As sintetases de galinha são codificadas por um único gene, denominado ChOAS, com pelo menos dois alelos, OAS*A e OAS*B. A diferença entre os dois alelos está no sexto exon do gene: uma seqüência de 96 nucleotídeos na porção UbL1 de OAS*A está deletada em OAS*B e o primeiro códon de UbL2 de OAS*A, TGC (Cys), é convertido para TAC (Tyr) em OAS*B. O alelo OAS*A codifica para uma proteína de 58kDa e o alelo OAS*B codifica para uma proteína de 54kDa. Em galinhas com genótipo OAS* A/B os alelos OAS*A e OAS*B são transcritos em mRNAs diferentes, porém relacionados, e ambos são traduzidos (Yamamoto *et al.* 1998; Tatsumi *et al.*, 2000).

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação de OAS de CEF foram desenhados abrangendo uma região comum aos *loci* A e B, portanto, independente da CEF ter advindo de galinhas homozigotas ou heterozigotas, o resultado esperado da amplificação por RT-PCR, é de uma banda única. Como uma medida indireta da indução de IFN pelo vírus CAM-70 em CEF, avaliamos a expressão de OAS de CEF em culturas em AD. Devido à baixa concentração celular em BD e, conseqüentemente, à quantidade insuficiente de RNA, não foi possível amplificar o gene para OAS nestas culturas (resultado não mostrado). Os resultados obtidos demonstraram a presença de uma banda única, consistente com o tamanho esperado

(449pb) nas culturas infectadas em AD, durante os 10 dias de coleta (Figura 5.6). A análise da expressão de OAS em paralelo com a expressão de β -actina demonstra que, embora possamos observar bandas com intensidades distintas ao longo dos 10 dias de coleta, elas estão diretamente relacionadas às diferentes quantidades de RNA extraído. Este resultado revela uma expressão contínua deste gene durante o período estudado. Apesar do IFN ter sido detectado somente a partir do 3º dia de coleta ele se manteve na cultura até o fim do período de observação sugerindo estar presente em quantidades suficientes desde o 1º dia, permitindo a continuidade da expressão de 2-5OAS. Diversos estudos já demonstraram a regulação positiva de 2-5 OAS pelo vírus do sarampo. Fujii e cols (1988) reportaram a indução de atividade de 2-5A pelo vírus CAM-70 em células K562, uma linhagem de células hematopoiéticas malignas. Entretanto, a literatura relata que vírus atenuados são indutores mais potentes da regulação positiva de genes da célula hospedeira do que vírus selvagens (Bolt *et al.*, 2002; Zilliox *et al.*, 2005).

7. CONCLUSÕES

- A análise genética do vírus CAM-70 após 10 passagens em CEF (VSF-10) demonstrou que nas condições de produção estabelecidas em Bio-Manguinhos o vírus CAM-70 é extremamente estável, não apresentando nenhuma mudança nucleotídica.
- Foram encontradas duas heterogeneidades na região entre os genes M e F nos três níveis de passagens e não correlacionadas com fatores de atenuação descritos na literatura.
- A análise dos 450 nucleotídeos da região C terminal do gene N de vírus isolados da vacina (FMS-7) através de plaqueamento em agarose não revelou variantes.
- O vírus do sarampo cepa CAM-70 demonstrou capacidade de induzir IFN, reduzindo a replicação e levando a diferenças de até $0,9 \log_{10}$ PFU/mL na cinética de crescimento viral.
- A indução do INF pelo vírus CAM-70 foi confirmada pelos resultados de expressão do gene de 2-5 OAS que se apresentou ativo apenas nas culturas infectadas com o vírus.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albrecht P, Ennis FA, Saltzman EJ, Krugman S. Persistence of maternal antibody in infants beyond 12 months: mechanism of measles vaccine failure. *Journal of Pediatrics* 1977; 91: 715-18.
- Andres O, Obojes K, Kim KS, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses. *The Journal of General Virology* 2003; 84: 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; 70: 203-9.
- Aversa G, Carballido J, Punnonen J, Chang CC, Hauser T, Cocks BG, De Vries JE. SLAM and its role in T cell activation and Th cell responses. *Immunology and Cell Biology* 1997; 75:202-5.
- Aversa G, Chang CC, Carballido JM, Cocks BG, de Vries JE. Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production. *The Journal of Immunology* 1997;158(9): 4036-44.
- 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. *Journal of Virology* 2002; 76: 7073-81.
- Bellini WJ, Englund G, Rozenblatt S, Arnheiter H, Richardson CD. Measles virus P gene codes for two proteins. *Journal of Virology* 1985; 53: 908-19.
- Bellini WJ, Rota JS, Rota PA. Virology of measles virus. *Journal of Infectious Diseases* 1994; 170 (Suppl 1): S15-S23.
- Bennett JV, Fernandez de Castro J, Valdespino-Gomez JL, Garcia-Garcia M de L, Islas-Romero R, Echaniz-Aviles G et al. Aerosolized measles and measles rubella vaccines induce better measles antibody booster responses than injected vaccines: randomized trials in Mexican schoolchildren. *Bulletin of the World Health Organization* 2002; 80: 806-12.
- Berry S, Hernandez H, Kanashiro R, Campos M, Azabache V, Gomez G et al. Comparison of high titer Edmonston-Zagreb, Biken-CAM and Schwarz measles vaccines in Peruvian infants. *The Pediatric infectious disease journal* 1992; 11: 822-7.
- Bisbal C, Silverman RH. Diverse functions of RNase L and implications in pathology. *Biochimie* 2007; 89:789-98.

- Bolt G, Berg K, Blixenkrone-Moller M. Measles virus-induced modulation of host-cell gene expression. *The Journal of general virology* 2002; 83:1157-65.
- van Boxel-Dezaire AH, Rani MR, Stark GR. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity* 2006; 25(3):361-72.
- Brugha R, Ramsay M, Forsey T Brown D. A study of maternally derived measles antibody in infants born to be naturally infected and vaccinated women. *Epidemiology and Infection* 1996; 117(3): 519-24.
- Caceres VM, Strebel PM, Sutter RW. Factors determining the prevalence of maternal antibody to measles virus throughout infancy: a review. *Clinical Infectious Diseases* 2000; 31(1): 110-9.
- Caignard G, Guerbois M, Labernardiere JL, Jacob Y, Jones LM. The Infectious Mapping Project I-MAP, Wild F, Tangy F, Vidalain PO. Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling. *Virology* 2007; 368(2): 351-62.
- Camacho LA, Freire MS, Yamamura AM, da Luz Leal M, Mann G. Seroconversion study of Biken CAM-70 measles vaccine. *Revista Nacional de Saúde Pública* 2000; 34(4): 358-66.
- Chabot S, Brewer A, Lowell G, Plante M, Cyr S, Burt DS et al. A novel intranasal Protollin-based measles vaccine induces mucosal and systemic neutralizing antibody responses and cell-mediated immunity in mice. *Vaccine* 2005; 23(11): 1374-83.
- Clements CJ, Milstein JB, Grabowsky M. Research into alternative measles vaccines in the 1990's. *Expanded Programme on Immunization, World Health Organization* 1988, Gen/88.11 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; 376(6537):260-3.
- Colamaria V, Marradi P, Merlin D, Moser C, Dulac O, Dompieri P et al. Acute measles encephalitis of the delayed type in an immunosuppressed child. *Brain & Development* 1989; 11(5): 322-6.
- 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 intergenic regions. *Virology* 1988; 164(2): 498-506.
- Cutts FT, Clements CJ, Bennett JV. Alternative routes of measles immunization: a review. *Biologicals* 1997; 25(3): 323-38.
- Cutts FT, Grabowsky M, Markowitz LE. The effect of dose strain of live attenuated measles vaccines on serological responses in young infants. *Biologicals* 1995; 23(1): 95-106.

- De Stefano F, Thompson WW. MMR vaccine and autism: an update of the scientific evidence. *Expert Review of Vaccines* 2004; 3(1):19-22.
- 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. *Journal of Virology* 2004; 78(21): 11632-40.
- Devaux P, von Messling V, Songsunthong W, Springfield C, Cattaneo R. Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation. *Virology* 2007; 360(1): 72-83.
- Dilraj A, Cutts FT, Bennett JV, Fernandez de Castro J, Cohen B, Coovadia HM. Persistence of measles antibody two years after revaccination by aerosol or subcutaneous routes. *The Pediatric Infectious Diseases Journal* 2000; 19(12):1211-3.
- Domingo E, Holland JJ. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In: Morse SS, editor. *The evolutionary biology of viruses*. New York: Raven Press 1994. p. 161-84.
- Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 1993; 75(2): 295-305.
- Farina C, Theil D, Semlinger B, Hohlfeld R, Meinel E. Distinct responses of monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. *International immunology* 2004; 16(6): 799-809.
- Feikin DR, Lezotte DC, Hamman RF, Salmon DA, Chen RT, Hoffman RE. Individual and community risks of measles and pertussis associated with personal exemptions to immunization. *The Journal of the American Medical Association* 2000; 284(24): 3145-50.
- Feldman JA. Protective value of inactivated measles vaccine. *American Journal Diseases Child* 1962; 103: 423-4.
- Freire, MS. Estudo sobre a propagação de vírus da febre amarela vacinal 17D e produção de vacina em culturas primárias de fibroblastos. Rio de Janeiro. 2004. Doutorado [Biologia Parasitária] Fundação Oswaldo Cruz.
- Fujii N, Kimura K, Murakami T, Indoh T, Ishida S, Fujinaga K et al. Suppression of interferon-induced oligo-2',5'-adenylate synthetase induction in persistent infection. *The Journal of General Virology* 1990; 71(12): 3071-4.
- Fujii N, Oguma K, Kimura K, Yamashita T, Ishida S, Fujinaga K et al. Oligo-2'-5' adenylate synthetase activity in K-562 cell lines persistently infected with measles or mumps virus. *The Journal of General Virology* 1988; 69(8):2085-91.

- Galler R, Pugachev KV, Santos CL, Ocran SW, Jabor AV, Rodrigues SG et al. Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. *Virology* 2001;290:309-19.
- Gans HA, Arvin AM, Galinus J, Logan L, DeHovitz R, Maldonado Y. Deficiency of the humoral immune response to measles vaccine in infants immunized at age 6 months. *The Journal of the American Medical Association* 1998; 280(6): 527-32.
- Gombart AF, Hirano A, Wong TC. Expression and properties of the V protein in acute measles virus and subacute sclerosing panencephalitis virus strains. *Virus Research* 1992; 25(1-2): 63-78.
- Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *The Journal of General Virology* 2000; 81(10): 2341-64.
- Gotoh B, Komatsu T, Takeuchi K, Yokoo J. Paramyxovirus strategies for evading the interferon response. *Reviews in Medical Virology* 2002; 12(6):337-57.
- Griffin D. Measles virus. In: DM Knipe, PM Howley, DE Griffin, MA Martin, RA Lamb, B Roizman & SE Straus (eds). *Fields Virology*. 4th ed Philadelphia. Lippincott, Williams & Wilkins 2001. p.1401-41.
- Hall WJ, Hall CB. Atypical measles in adolescents: evaluation of clinical and pulmonary function. *Annals of Internal Medicine* 1979; 90(6): 882-6.
- Halsey NA. Increased mortality after high-titer measles vaccines: too much of a good thing. *The Pediatric Infectious Diseases Journal* 1993; 12(6): 462-5.
- Hashimoto K, Ono N, Tatsuo H, Minagawa H, Takeda M, Takeuchi K et al. SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *Journal of Virology* 2002; 76(13): 6743-9.
- Hilleman MR. Current overview of the pathogenesis and prophylaxis of measles with focus on practical implications. *Vaccine* 2001; 20(5-6): 651-65.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1992; 89(18): 8745-9.
- Hirayama M. Measles vaccine used in Japan. *Reviews of Infectious Diseases* 1983; 5(3): 495-503.
- Ho M, Enders JF. Further studies on an inhibitor of viral activity appearing in infected cell cultures and its role in chronic viral infections. *Virology* 1959; 9:446-77.

- Horikami SM, Moyer SA. Structure, transcription and replication of measles virus. *Current Topics Microbiology and Immunology* 1995; 191: 35-50.
- Hsu EC, Sarangi F, Iorio C, Sidhu MS, Udem SA, Dillehay DL et al. A single amino acid change in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD46 and reveals another receptor on marmoset B cells. *Journal of Virology* 1998; 72(4): 2905-16.
- Hu A, Cattaneo R, Schwartz S, Norrby E. Role of N-linked oligosaccharide chains in the processing and antigenicity of measles virus haemagglutinin protein. *The Journal of General Virology* 1994; 75(5): 1043-52.
- Hussey GD, Clements CJ. Clinical problems in measles cases management. *Annals of Tropical Paediatrics* 1996; 16(4): 307-17.
- Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London* 1957; 147(927):258-67.
- Jansen VA, Stollenwerk N, Jensen HJ, Ramsay ME, Edmunds WJ, Rhodes CJ. Measles outbreaks in a population with declining vaccine uptake. *Science* 2003; 301(5634): 804.
- Karzon DT, Winkelstein W Jr, Jenss R, Gresham GE, Mosher WE. Field trial of inactivated measles vaccine. *American Journal of Diseases of Child* 1962; 103: 425-6.
- Kato A, Kiyotani K, Sakai Y, Yoshida T, Nagai Y. The paramyxovirus, Sendai virus, V protein, encodes a luxury function required for viral pathogenesis. *The EMBO Journal* 1997; 16(3): 578-87.
- Katz SL. Polio – new challenges in 2006. *Journal of Clinical Virology* 2006; 36:163-5.
- Katze MG, He Y, Gale Jr. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2(9): 675-87.
- 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. *Journal of Medical Virology* 2000; 62: 91-8.
- Kost TA, Theodorakis N, Hughes SH. The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acids Research* 1983; 11(23):8287-301
- Krugman S, Katz SL. Childhood immunization procedures. *The Journal of the American Medical Association* 1977; 237(20): 2228-30.
- Lamb RA & Kolakofsky D. *Paramyxoviridae: The viruses and their replication*. In: DM Knipe, PM Howley, DE Griffin, MA Martin, RA Lamb, B Roizman & SE Straus (eds). *Fields Virology*. 4th ed Philadelphia. Lippincott, Williams & Wilkins 2001. p.1305-40.
- Lecouturier V, Fayolle J, Caballero M, Carabana J, Celma ML, Fernandez-Munoz R et al. Identification of two amino acids in the hemagglutinin glycoprotein of measles virus

- (MV) that govern hemadsorption, HeLa cell fusion, and CD46 downregulation: phenotypic markers that differentiate vaccine and wild-type MV strains. *Journal of Virology* 1996; 70(7): 4200-4.
- Lennon JL, Black FL. Maternally derived measles immunity in era of vaccine-protected mothers. *The Journal of Pediatrics* 1986; 108(5): 671-6.
- Levy DE, Garcia-Sastre A. The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2001;12(2-3):143-56.
- Lloyd RE, Weigent DA, Stanton GJ. Microassay for Sindbis virus and interferon activity. *Journal of Clinical Microbiology* 1983;18(2):296-9.
- Liermann H, Harder TC, Lochelt M, von Messling V, Baumgartner W, Moennig V et al. Genetic analysis of the central untranslated genome region and the proximal coding part of the F gene of wild-type and canine distemper morbilliviruses. *Virus Genes* 1998; 17(3): 259-70.
- Liston P, Briedis DJ. Measles virus V protein binds zinc. *Virology* 1994; 198(1): 399-404.
- Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annual Review of Immunology* 1991; 9:431-55.
- Liu X, Bankamp B, Xu W, Bellini WJ, Rota PA. The genomic termini of wild-type and vaccine strains of measles virus. *Virus Research* 2006; 122(1-2):78-84.
- Lowenthal JW, Staeheli P, Schultz U, Sekellick MJ, Marcus PI. Nomenclature of avian interferon proteins. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2001; 21(7):547-9.
- 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. *The New England Journal of Medicine* 2002; 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. *The Journal of General Virology* 2000; 81(2):441-9.
- Makino S. Development and characteristics of live AIK-C measles virus vaccine: a brief report. *Reviews of Infectious Diseases* 1983; 5(3): 504-5.
- Malathi K, Paranjape JM, Bulanova E, Shim M, Guenther-Johnson JM, Faber PW et al. A transcriptional signaling pathway in the IFN system mediated by 2'-5'-oligoadenylate activation of RNase L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* 2005; 102(41):14533-8.

- Maldonado YA, Lawrence EC, DeHovitz R, Hartzell H, Albrecht P. Early loss of passive measles antibody in infants of mothers with vaccine-induced immunity. *Pediatrics* 1995; 96(3):447-50.
- Manchester M, Eto DS, Valsamakis A, Liton PB, Fernandez-Muñoz R, Rota PA et al. Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor. *Journal of Virology* 2000; 74(9): 3967-74.
- Markowitz LE, Albrecht P, Rhodes P, Demonteverde R, Swint E, Maes EF et al. Changing levels of measles antibody titers in women and children in the United States: impact on response to vaccination. Kaiser Permanente Measles Vaccine Trial Team. *Pediatrics* 1996; 97(1):53-8.
- Markowitz LE, Sepulveda J, Diaz-Ortega JL, Valdespino, JL, Albrecht P, Zell ER et al. Immunization of six-month-old infants with different doses of Edmonston-Zagreb and Schwarz measles vaccines. *The New England Journal of Medicine* 1990; 322(9):580-7.
- Mashimo T, Glaser P, Lucas M, Simon-Chazottes D, Ceccaldi PE, Montagutelli X et al. Structural and functional genomics and evolutionary relationships in the cluster of genes encoding murine 2',5'-oligoadenylate synthetases. *Genomics* 2003; 82(5):537-52.
- Merz DC, Scheid A, Choppin PW. The importance of antibody to fusion glycoprotein (F) of paramyxoviruses in the prevention of spread of infection. *The Journal of Experimental Medicine* 1980; 151(2):275-88.
- Ministério da Saúde. Sarampo – Situação da doença no Brasil [online] [capturado em 22 de fevereiro de 2007a] Disponível em URL: http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=22332
- Ministério da Saúde. Surto de sarampo no interior da Bahia: atualização [online] [capturado em 22 de fevereiro de 2007b] Disponível em URL: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/sarampo_300107.pdf
- Mirchamsy H, Rapp F. Role of interferon in replication of virulent and attenuated strains of measles virus. *The Journal of General Virology* 1969; 4(4):513-22.
- Moss WJ and Griffin DE. Global measles elimination. *Nature Reviews Microbiology* 2006; 4(12): 900-8.
- Mulders MN, Truong AT, Muller CP. Monitoring of measles elimination using molecular epidemiology. *Vaccine* 2001; 19(17-19): 2245-9.
- Muller CP. Measles elimination: old and new challenges? *Vaccine* 2001; 19: 2258-61.
- Murch S. A statement by Dr. Simon Murch. Allegations concerning our 1998 study. *Lancet* 2004; 363(9411): 821-2.

- Nanda I, Sick C, Munster U, Kaspers B, Scharl M, Staeheli P, Schmid M. Sex chromosome linkage of chicken and duck type I interferon genes: further evidence of evolutionary conservation of the Z chromosome in birds. *Chromosoma* 1998; 107(3):204-10.
- Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rabourdin-Combe C, Gerlier D. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *Journal of Virology* 1993; 67(10): 6025-32.
- Naniche D, Yeh A, Eto D, Manchester M, Friedman RM, Oldstone MBA. Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of alpha/beta interferon production. *Journal of Virology* 2000; 74(16): 7478-84.
- Nickells MW, Atkinson JP. Characterization of CR1- and membrane cofactor protein-like proteins of two primates. *Journal of Immunology* 1990; 144(11):4262-8.
- Norrby E, Gollmar Y. Identification of measles-virus specific hemolysis inhibiting antibodies separate from hemagglutination-inhibiting antibodies. *Infection and Immunity* 1975; 11(2):231-9.
- 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. *The Journal of Infectious Disease* 1975; 132(3): 262-9.
- Norrby E. Hemagglutination by measles virus. I. The production of hemagglutinin in tissue culture and the influence of different conditions on the hemagglutinating system. *Archiv für die gesamte Virusforschung* 1962; 12:153-63.
- Norrby E. Occurrence of antibodies against envelope components after immunization with formalin-inactivated and live measles vaccine. *Journal of Biological Standardization* 1975; 3(4): 375-80.
- Ogura H, Sato H, Kamiya S, Nakamura S. Glycosylation of measles virus haemagglutinin protein in infected cells. *The Journal of General Virology* 1991; 72(11): 2679-84.
- Ohno S, Ono N, Takeda M, Takeuchi K, Yanagi Y. Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *The Journal of General Virology* 2004; 85(10):2991-9.
- Okuno Y, Ueda S, Kurimura T, Suzuki N, Yamanishi K. Studies on further attenuated live measles vaccine. VII. Development and evaluation of CAM-70 measles vaccine virus. *Biken Journal*, 1971; 14(3): 253-8.
- Oliveira MI, Rota PA, Curti SP, Figueiredo CA, Afonso AM, Theobaldo M et al. Genetic homogeneity of measles viruses associated with a measles outbreak, São Paulo, Brazil, 1997. *Emerging Infectious Diseases* 2002; 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. *Journal of Virology* 2001; 75(9): 4399-401.
- Osterhaus A, Van Amerongen G, Van Binnendijk R. Vaccine strategies to overcome maternal antibody mediated inhibition of measles vaccine. *Vaccine* 1998; 16(14-15): 1479-81.
- Ovsyannikova IG, Jacobson RM, Vierkant RA, Shane Pankratz V, Jacobsen SJ, Poland GA. Associations between human leukocyte antigen (HLA) alleles and very high levels of measles antibody following vaccination. *Vaccine* 2004; 22(15-16): 1914-20.
- Palosaari H, Parisien JP, Rodriguez JJ, Ulane CM, Horvath CM. STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *Journal of Virology* 77(13): 7635-44.
- Pan CH, Valsamakis A, Colella T, Nair N, Adams RJ, Polack FP et al. Inaugural Article: Modulation of disease, T cell response, and measles virus clearance in monkeys vaccinated with H-encoding alphavirus replicon particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2005; 102(33): 11581-8.
- Papania M, Baughman AL, Lee S, Cheek JE, Atkinson W, Redd SC et al. Increased susceptibility to measles in infants in the United States. *Pediatrics* 1999; 104(5): e59.
- Parks CL, Lerch RA, Walpita P, Wang H-P, Sidhu MS, Udem SA. Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *Journal of Virology*, 2001; 75(2): 910-20.
- Pasetti MF, Barry EM, Losonsky G, Singh M, Medina-Moreno SM, Polo JM et al. Attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhi* and *Shigella flexneri* 2a strains mucosally deliver DNA vaccines encoding measles virus hemagglutinin, inducing specific immune responses and protection in cotton rats. *Journal of Virology* 2003; 77(9): 5209-17.
- Pedersen IR, Mordhorst CH, Glikmann G, von Magnus H. Subclinical measles infection in vaccinated seropositive individuals in arctic Greenland. *Vaccine* 1989; 7(4): 345-8.
- Peradze TV, Smorodintsev AA. Epidemiology and specific prophylaxis of measles. *Reviews of Infectious Diseases* 1983; 5(3):487-90.
- Peries JR, Chany C. Studies on measles viral hemagglutinin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1962; 110: 477-82.
- Perry RT, Halsey NA. The clinical significance of measles virus: a review. *The Journal of Infectious Diseases* 2004; 189 (Suppl 1): S4-16.
- Plumet S, Herschke F, Bourhis JM, Valentin H, Longhi S, Gerlier D. Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response. *PLoS ONE*. 2007; 2(3):e279.

- Polack FP, Lee SH, Permar S, Manyara E, Nousari HG, Jeng Y et al. Successful DNA immunization against measles: neutralizing antibody against either the hemagglutinin or fusion glycoprotein protects rhesus macaques without evidence of atypical measles. *Nature Medicine* 2000; 6(7): 776-81.
- Premenko-Lanier M, Rota PA, Rhodes G, Verhoeven D, Barouch DH, Lerche NW et al. DNA vaccination of infants in the presence of maternal antibody: a measles model in the primate. *Virology* 2003; 307(1): 67-75.
- Premenko-Lanier M, Rota PA, Rhodes GH, Bellini WJ, McChesney MB. Protection against challenge with measles virus (MV) in infant macaques by an MV DNA vaccine administered in the presence of neutralizing antibody. *The Journal of Infectious Diseases* 2004; 189(11): 2064-71.
- Prevots DR, Parise MS, Segatto TC, Siqueira MM, dos Santos ED, Ganter B et al. Interruption of measles transmission in Brazil, 2000-2001. *The Journal of Infectious Diseases* 2003; 187 (Suppl 1): S111-20.
- Pütz MM, Bouche FB, Swart RL and Muller C. Experimental vaccines against measles in a world of changing epidemiology. *International Journal of Parasitology* 2003; 33(5-6): 525-45.
- Rall GF. Measles virus 1998-2002: Progress and controversy. *Annual Review of Microbiology* 2003; 57: 343-67.
- Reutter GL, Cortese-Grogan C, Wilson J, Moyer SA. Mutations in the measles virus C protein that up regulate viral RNA synthesis. *Virology* 2001; 285(1):100-9.
- Riddell MA, Rota JS, Rota PA. Review of the temporal and geographical distribution of measles virus genotypes in the prevaccine and postvaccine eras. *Virology Journal*, 2005; 2: 87.
- Rima B, Duprex WP. Molecular mechanisms of measles virus persistence. *Virus Research*, 2005; 111(2): 132-47.
- 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. *The Journal General Virology* 1997; 78(1): 97-106.
- 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. *The Journal of Infectious Disease* 1996; 173(1): 32-7
- Rota JS, Wang Z-D, Rota P, Bellini WJ. Comparison of sequences of the H, F and N coding genes of measles virus vaccine strains. *Virus Research* 1994; 31(3):317-30.

- Rota PA, Bellini WJ. Update on the global distribution of genotypes of wild type measles viruses. *The Journal of Infectious Diseases* 2003; 187 (Suppl 1): S270-6.
- Rota PA, Khan AS, Durigon E, Yuran T, Villamarzo YS, Bellini WJ. Detection of measles virus RNA in urine specimens from vaccine recipients. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33(9): 2485-8.
- Rota PA, Liffick SL, Rota JS, Katz RS, Redd S, Papania M, Bellini WJ. Molecular epidemiology of measles viruses in the United States, 1997-2001. *Emerging Infectious Diseases* 2002; 8(9): 902-8.
- Rubin H. Chick embryo cells. In: Kruse PF, Patterson MK, editors. *Tissue culture methods and applications*. New York, Academic Press, 1973:119-23.
- Rubinstein S, Familletti PC, Pestka S. Convenient assay for interferons. *Journal of Virology* 1981;37(2):755-8.
- Samuel CE. Antiviral actions of interferon. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14(4):778-809.
- Santos PR, Azevedo ML, Borges MB, Freire MS, Nascimento JP, Moraes MT. Comparative sequence analysis of the P-, M- and L-coding region of the measles virus CAM-70 live attenuated vaccine strain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2003; 36(11):1475-84.
- Sato TA, Kohama T, Sugiura A. Intracellular processing of measles virus fusion protein. *Archives of Virology* 1988; 98(1-2):39-50.
- Shaffer JA, Bellini WJ, Rota PA. The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology* 2003; 315(2):389-97.
- Schneider H, Kaelin K, Billeter MA. Recombinant measles viruses defective for RNA editing and V protein synthesis are viable in cultured cells. *Virology* 1997; 227(2): 314-22.
- Schrag ST, Rota PA, Bellini WJ. Spontaneous mutation rate of measles virus: direct estimation based on mutations conferring monoclonal antibody resistance. *Journal of Virology* 1999; 73(1):51-4.
- Schultz U, Kaspers B, Staeheli P. The interferon system of non-mammalian vertebrates. *Developmental and Comparative Immunology* 2004; 28(5):499-508.
- Schumacher B, Bernasconi D, Schultz U, Staeheli P. The chicken Mx promoter contains an ISRE motif and confers interferon inducibility to a reporter gene in chick and monkey cells. *Virology* 1994; 203(1):144-8.
- Secretaria de Saúde, Estado do Ceará [online]. Informe Técnico Nº 03/2006/Nunas/Nuepi/Copos/Sesa – Surto de sarampo no estado da Bahia [capturado

- em 22 de fevereiro de 2007] Disponível em URL: http://www.saude.ce.gov.br/internet/publicacoes/informet/informet_sarampo_12_06.pdf
- Sedlmeier R, Neubert WJ. The replicative complex of paramyxoviruses: structure and function. *Advances in Virus Research*, 1998; 50:101-39.
- Sekellick MJ, Ferrandino AF, Hopkins DA, Marcus PI. Chicken interferon gene: cloning, expression, and analysis. *Journal of Interferon Research* 1994;14(2):71-9.
- Seng R, Samb B, Simondon F, Cisse B, Soumare M, Jensen H et al. Increased long-term mortality associated with rash after measles vaccination in rural Senegal. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 1999; 18(1):48-52.
- Sidhu MS, Chan J, Kaelin K, Spielhofer P, Radecke F, Schneider H et al. Rescue of synthetic measles virus minireplicons: measles genomic termini direct efficient expression and propagation of a reporter gene. *Virology*, 1995; 208(2): 800-7.
- Sidorenko SP, Clark EA. Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. *Journal of Immunology* 1993; 151(9):4614-24.
- Sick C, Schultz U, Staeheli P. A family of genes coding for two serologically distinct chicken interferons. *The Journal of Biological Chemistry* 1996; 271(13):7635-9.
- Sick C, Schultz U, Munster U, Meier J, Kaspers B, Staeheli P. Promoter structures and differential responses to viral and nonviral inducers of chicken type I interferon genes. *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(16):9749-54.
- Skiadopoulos MH, Surman SR, Riggs JM, Collins PL, Murphy BR. A chimeric human-bovine parainfluenza virus type 3 expressing measles virus hemagglutinin is attenuated for replication but is still immunogenic in rhesus monkeys. *Journal of Virology* 2001; 75(21):10498-504.
- 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. *The Journal of Infectious Diseases* 2004; 189 (Suppl 1): S251-S257.
- Strebel PM, Papania MJ, Halsey NA. Measles vaccine. In: Plotkin and Orenstein (eds). *Vaccines*. 4th ed Philadelphia. WB Saunders Company. 2003. Chap. 19.
- Stewart WE 2nd, Gosser LB, Lockart RZ Jr. Priming: a nonantiviral function of interferon. *Journal of Virology* 1971; 7(6):792-801.
- Suzuki K, Morita M, Katoh M, Kidokoro M, Saika S, Yoshizawa S et al. Development and evaluation of the TD97 measles virus vaccine. *Journal of Medical Virology* 1990; 32(3):194-201.

- Tahara M, Takeda M, Seki F, Hashiguchi T, Yanagi Y. Multiple amino acid substitutions in hemagglutinin are necessary for wild-type measles virus to acquire the ability to use receptor CD46 efficiently. *Journal of Virology* 2007; 81(6):2564-72.
- Takeda M, Ohno S, Seki F, Nakatsu Y, Tahara M, Yanagi Y. Long untranslated regions of the measles virus M and F genes control virus replication and cytopathogenicity. *Journal of Virology* 2005; 79(22):7838-44.
- Takeuchi K, Kadota S, Takeda M, Miyajima N, Nagata K. Measles virus V protein blocks interferon (IFN)- α/β but not IFN- γ signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Letters* 2003; 545(2-3):177-82.
- Tamin A, Rota PA, Wang ZD, Heath JL, Anderson LJ, Bellini WJ. Antigenic analysis of current wild type and vaccine strains of measles virus. *The Journal of Infectious Diseases* 1994; 170(4):795-801
- Tanaka K, Xie M, Yanagi Y. The hemagglutinin of recent measles virus isolates induces cell fusion in a marmoset cell line, but not in other CD46-positive human and monkey cell lines, when expressed together with the F protein. *Archives of Virology* 1998; 143(2):213-25.
- Tatsumi R, Hamada K, Sekiya S, Wakamatsu M, Namikawa T, Mizutani M, Sokawa Y. 2',5'-oligoadenylate synthetase gene in chicken: gene structure, distribution of alleles and their expression. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1494(3):263-8.
- Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 2000; 406(6798):893-7.
- Taylor MJ, Godfrey E, Baczko K, ter Meulen V, Wild TF, Rima BK. Identification of several different lineages of measles virus. *The Journal of General Virology* 1991; 72(1):83-8.
- Taylor WR, Mambu RK, Ma-Disu M, Weinman JM. Measles control efforts in urban Africa complicated by high incidence of measles in the first year of life. *American Journal of Epidemiology* 1988; 127(4):788-94.
- Uejima H, Nakayama T, Komase K. Passage in Vero cells alters the characteristics of measles AIK-C vaccine strain. *Vaccine* 2006; 24(7): 931-6.
- Varsanyi TM, Utter G, Norrby E. Purification, morphology and antigenic characterization of measles virus envelope components. *The Journal of General Virology* 1984; 65(2):355-66.
- Vilcek J, Sen GC. Interferons and other cytokines In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 3rd ed. Philadelphia:Lippincott-Raven; 1996. p. 375-99.
- Vincent S, Gerlier D, Manie SN. Measles virus assembly within membrane rafts. *Journal of Virology* 2000; 74(21): 9911-5.

- Volckaert-Vervliet G, Billiau A. Induction of interferon in human lymphoblastoid cells by Sendai and measles viruses. *The Journal of General Virology* 1977; 37(1):199-203.
- Wakefield AJ, Murch SH, Anthony A, Linnell J, Casson DM, Malik M et al. Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children. *Lancet* 1998; 351(9103):637-41.
- Wardrop EA, Briedis DJ. Characterization of V protein in measles virus –infected cells. *Journal of Virology* 1991; 65(7):3421-8.
- Warren J, Gallian MJ. Concentrated inactivated measles-virus vaccine. Preparation and antigenic potency. *American Journal of Diseases of Children* 1962; 103:418-23.
- Webster DE, Thomas MC, Huang Z, Wesselingh SL. The development of a plant-derived measles virus vaccine. *Vaccine* 2005; 23(15):1859-65.
- Weigent DA, Stanton GJ, Langford MP, Lloyd RE, Baron S. Virus yield-reduction assay for interferon by titration of infectious virus. *Methods in Enzymology* 1981; 78:346-51.
- Wild TF, Malvoisin E, Buckland R. Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *The Journal of General Virology* 1991; 72(2):439-42.
- Witko SE, Kotash C, Sidhu MS, Udem SA, Parks CL. Inhibition of measles virus minireplicon-encoded reporter gene expression by V protein. *Virology* 2006; 348(1):107-19.
- Wong TC, Wipf G, Hirano A. The measles virus matrix gene and gene product defined by in vitro and in vivo expression. *Virology* 1987; 157(2):497-508.
- Wong-Chew RM, Islas-Romero R, Garcia-Garcia M de L, Beeler JA, Audet S, Santos-Preciado JI et al. Induction of cellular and humoral immunity after aerosol or subcutaneous administration of Edmonston-Zagreb measles vaccine as a primary dose to 12-month-old children. *The Journal of Infectious Diseases* 2004; 189(2):254-7.
- World Health Organization. Fact sheet n° 286, revised January 2007 - Measles [capturado em 6 de fevereiro de 2007] Disponível em URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/>
- World Health Organization: Expanded Programme on Immunization (EPI). Standardization of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses. *Weekly Epidemiological Record* 1998; 73: 265-9.
- World Health Organization: Nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses (update). Part I. *Weekly Epidemiological Record* 2001; 76: 242-7.

- World Health Organization: Update of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses: new genotypes and reference strains. *Weekly Epidemiological Record* 2003; 78: 229-32.
- 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 Research* 1998; 54(2):147-56.
- Yanagi Y, Takeda M, Ohno S. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *The Journal General Virology* 2006; 87(10):2767-79.
- Yeager AS, Davis JH, Ross LA, Harvey B. Measles immunization. Successes and failures. *The Journal of the American Medical Association* 1977; 237(4):347-51.
- Yokota S, Saito H, Kubota T, Yokosawa N, Amano K, Fujii N. Measles virus supresses interferon- α signaling pathway: supression of Jak 1 phosphorylation and association of viral acessory proteins, C and V, with interferon- α receptor complex. *Virology* 2003; 306(1):135-46.
- Yokota S, Okabayashi T, Yokosawa N, Fujii N. Growth arrest of epithelial cells during measles virus infection is caused by upregulation of interferon regulatory factor 1. *Journal of Virology* 2004; 78(9):4591-8.
- Zilliox MJ, Parmigiani G, Griffin DE. Gene expression patterns in dendritic cells infected with measles virus compared with other pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* 2006;103(9):3363-8.

ANEXO I

Anexo I. Alinhamento das seqüências nucleotídicas do genoma completo (nt 1-15894) de cepas vacinais do vírus do sarampo em comparação com a cepa protótipo Edmonston selvagem e o isolado selvagem MeVIchinoseB95a. Os pontos representam o mesmo nucleotídeo presente na cepa Edmonston selvagem. Números de acesso ao GenBank: Edmonston wt = Edmonston selvagem: AF266288; três níveis de passagem da cepa CAM-70, VSF-3: DQ345721; FMS-7: DQ345722; VSF-10: DQ345723; Schwarz (AF266291) e Moraten (AF266287) partilham seqüências genômicas idênticas; AIK-C: AF266286; Edm-Zagreb = Edmonston-Zagreb: AY486084; Rubeovax: AF266289; Changchun-47: AF128250; MeVIchinoseB95a: NC001498.

	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+	
	610 620 630 640 650 660 670 680 690 700	
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+	
Edmonston-wt	TGATTCTGGGTACCATCCTAGCCCAAATTTGGGTCTTGCTCGCAAAGGCGGTTACGGCCCCAGACACGGCAGCTGATTCCGGAGCTAAGAAGGTGGATAAA	700
FMS-7	700
VSF-3	700
VSF-10	700
AIK-C	700
Moraten	700
Schwarz	700
Edm-ZagrebT.....	700
Rubeovax	700
Changchun-47	700
MeV-IchinoseB95aT.....G.C.....	700

	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+	
	710 720 730 740 750 760 770 780 790 800	
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+	
Edmonston-wt	GTACACCCAACAAAGAAGGGTAGTTGGTGAATTTAGATTGGAGAGAAAATGGTTGGATGTGGTGAGGAACAGGATTGCCGAGGACCTCTCCTTACGCCGA	800
FMS-7	800
VSF-3	800
VSF-10	800
AIK-C	800
Moraten	800
Schwarz	800
Edm-Zagreb	800
RubeovaxG.....	800
Changchun-47	800
MeV-IchinoseB95aT.....	800

	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+	
	810 820 830 840 850 860 870 880 890 900	
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+	
Edmonston-wt	TTCATGGTCGCTCTAATCCTGGATATCAAGAGAACACCCGAAACAAACCCAGGATTGCTGAAATGATATGTGACATTGATACATATATCGTAGAGGCAG	900
FMS-7	900
VSF-3	900
VSF-10	900
AIK-C	900
Moraten	900
Schwarz	900
Edm-Zagreb	900
Rubeovax	900
Changchun-47	900
MeV-IchinoseB95aG.....G.....G.....T.....	900

	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	
Edmonston-wt	GATTAGCCAGTTTTATCCTGACTATTAAGTTTGGGATAGAACTATGTATCCTGCTCTTGGACTGCATGAATTTGCTGGTGAGTTATCCACACTTGAGTC										1000
FMS-7	..C.....A..										1000
VSF-3	..C.....A..										1000
VSF-10	..C.....A..										1000
AIK-C										1000
Moraten										1000
Schwarz										1000
Edm-Zagreb										1000
Rubeovax										1000
Changchun-47										1000
MeV-IchinoseB95a										1000
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+											
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	
Edmonston-wt	CTTGATGAACCTTTACCAGCAAATGGGGGAACTGCACCCTACATGGTAATCCTGGAGAACTCAATTCAGAACAAGTTCAGTGCAGGATCATACCCTCTG										1100
FMS-7										1100
VSF-3										1100
VSF-10										1100
AIK-C										1100
Moraten										1100
Schwarz										1100
Edm-Zagreb										1100
Rubeovax										1100
Changchun-47										1100
MeV-IchinoseB95aT.....A.....A.....										1100
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+											
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	
Edmonston-wt	CTCTGGAGCTATGCCATGGGAGTAGGAGTGGAACTTGAAAACCTCCATGGGAGGTTTGAACCTTTGGCCGATCTTACTTTGATCCAGCATATTTTAGATTAG										1200
FMS-7										1200
VSF-3										1200
VSF-10										1200
AIK-C										1200
Moraten										1200
Schwarz										1200
Edm-Zagreb										1200
Rubeovax										1200
Changchun-47										1200
MeV-IchinoseB95aT.....										1200

	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	
Edmonston-wt	GGCAAGAGATGGTAAGGAGGTCAGCTGGAAAGGTTCAGTTCCACATTGGCATCTGAACTCGGTATCACTGCCGAGGATGCAAGGCTTGTTTCAGAGATTGC										1300
FMS-7G.....										1300
VSF-3G.....										1300
VSF-10G.....										1300
AIK-C										1300
Moraten										1300
Schwarz										1300
Edm-Zagreb										1300
Rubeovax										1300
Changchun-47										1300
MeV-IchinoseB95aG.....C.....										1300

	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	
Edmonston-wt	AATGCATACTACTGAGGACAAGATCAGTAGAGCGGTTGGACCCAGACAAGCCCAAGTATCATTTCTACACGGTGATCAAAGTGAGAATGAGCTACCGAGA										1400
FMS-7										1400
VSF-3										1400
VSF-10										1400
AIK-C										1400
Moraten										1400
Schwarz										1400
Edm-Zagreb										1400
Rubeovax										1400
Changchun-47										1400
MeV-IchinoseB95aG.....C.....G.....AG..										1400

	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	
Edmonston-wt	TTGGGGGGCAAGGAAGATAGGAGGGTCAAACAGAGTCGAGGAGAAGCCAGGGAGAGCTACAGAGAAACCGGGCCAGCAGAGCAAGTGATGCGAGAGCTG										1500
FMS-7C.....										1500
VSF-3C.....										1500
VSF-10C.....										1500
AIK-C										1500
Moraten										1500
Schwarz										1500
Edm-Zagreb										1500
Rubeovax										1500
Changchun-47										1500
MeV-IchinoseB95aG.....G.....T.....										1500

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          1510      1520      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  CCCATCTTCCAACCGGCACACCCCTAGACATTGACACTGCATCGGAGTCCAGCCAAGATCCGCAGGACAGTTCGAAGGTCAGCTGACGCCCTGCTTAGGCT 1600
FMS-7        .....
VSF-3        .....
VSF-10       .....
AIK-C        .....
Moraten      .....
Schwarz      .....
Edm-Zagreb   .....
Rubeovax     .....
Changchun-47 .....
MeV-IchinoseB95a .....C.....A...TG.....AG.....C.....

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680      1690      1700
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  GCAAGCCATGGCAGGAATCTCGGAAGAACAAGGCTCAGACACGGACACCCCTATAGTGTACAATGACAGAAATCTTCTAGACTAGGTGCGAGAGGCCGAG 1700
FMS-7        .....
VSF-3        .....
VSF-10       .....
AIK-C        .....
Moraten      .....
Schwarz      .....
Edm-Zagreb   .....
Rubeovax     .....
Changchun-47 .....
MeV-IchinoseB95a .....T.....GG..A.....G.....

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          1710      1720      1730      1740      1750      1760      1770      1780      1790      1800
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  GACCAGAACAACATCCGCCTACCCCTCCATCATTTGTTATAAAAAAATTAGGAACCAGGTCCACACAGCCGCCAGCCCATCAACCATCCACTCCCACGATTG 1800
FMS-7        .G.....
VSF-3        .G.....
VSF-10       .G.....
AIK-C        .....
Moraten      .G.....A.....
Schwarz      .G.....A.....
Edm-Zagreb   .....
Rubeovax     .G.....
Changchun-47 .....
MeV-IchinoseB95a .....A.C.....C.....

```


	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	
Edmonston-wt	GAGCCGATGGCAGAAGAGCAGGCACGCCATGTCAAAAACGGACTGGAATGCATCCGGGCTCTCAAGGCCGAGCCCATCGGCTCACTGGCCATCGAGGAAG										1900
FMS-7A.....A.....										1900
VSF-3A.....A.....										1900
VSF-10A.....A.....										1900
AIK-C										1900
MoratenA.....										1900
SchwarzA.....										1900
Edm-Zagreb										1900
RubeovaxA.....										1900
Changchun-47										1900
MeV-IchinoseB95aG.....										1900

	1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000	
Edmonston-wt	CTATGGCAGCATGGTCAGAAATATCAGACAACCCAGGACAGGAGCGAGCCACCTGCAGGGAAGAGAAGGCAGGCAGTTCGGGTCTCAGCAAACCATGCCT										2000
FMS-7										2000
VSF-3										2000
VSF-10										2000
AIK-C										2000
Moraten										2000
Schwarz										2000
Edm-Zagreb										2000
Rubeovax										2000
Changchun-47										2000
MeV-IchinoseB95a	.C.....C.....A.....G.....										2000

	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100	
Edmonston-wt	CTCAGCAATTGGATCAACTGAAGGCGGTGCACCTCGCATCCGCGCCAGGGACCTGGAGAGAGCGATGACGACGCTGAAACTTTGGGAATCCCCCAAGA										2100
FMS-7T.....G.....										2100
VSF-3T.....G.....										2100
VSF-10T.....G.....										2100
AIK-CT.....										2100
MoratenT.....										2100
SchwarzT.....										2100
Edm-ZagrebT.....										2100
RubeovaxT.....										2100
Changchun-47T.....										2100
MeV-IchinoseB95aT.....T.....A.....T.....										2100

	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	
Edmonston-wt	AATCTCCAGGCATCAAGCACTGGGTTACAGTGTATTATGTTTATGATCACAGCGGTGAAGCGGTTAAGGGAATCCAAGATGCTGACTCTATCATGGTTC										2200
FMS-7	G.....G.....G.....G.....										2200
VSF-3	G.....G.....G.....G.....										2200
VSF-10	G.....G.....G.....G.....										2200
AIK-C										2200
MoratenC.....										2200
SchwarzC.....										2200
Edm-Zagreb										2200
RubeovaxC.....										2200
Changchun-47C.....										2200
MeV-IchinoseB95aC.....										2200

	2210	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300	
Edmonston-wt	AATCAGGCCTTGATGGTGATAGCACCCCTCTCAGGAGGAGACAATGAATCTGAAAACAGCGATGTGGATATTGGCGAACCTGATACCGAGGGATATGCTAT										2300
FMS-7G.....G.....										2300
VSF-3G.....G.....										2300
VSF-10G.....G.....										2300
AIK-CA.....										2300
Moraten										2300
Schwarz										2300
Edm-Zagreb										2300
Rubeovax										2300
Changchun-47A.....										2300
MeV-IchinoseB95aG.....										2300

	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400	
Edmonston-wt	CACTGACCGGGATCTGCTCCCATCTCTATGGGGTTCAAGGCTTCTGATGTTGAAACTGCAGAAGGAGGGAGATCCACGAGCTCCTGAGACTCCAATCC										2400
FMS-7										2400
VSF-3										2400
VSF-10										2400
AIK-C										2400
Moraten										2400
Schwarz										2400
Edm-Zagreb										2400
Rubeovax										2400
Changchun-47										2400
MeV-IchinoseB95aA.....										2400

	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490	2500	
Edmonston-wt	AGAGGCAACAACCTTTCCGAAGCTTGGGAAAACCTCTCAATGTTCTCCGCCCGGACCCCGGTAGGGCCAGCACTTCCGAGACACCCATTAAAAAGGGCA										2500
FMS-7G.....										2500
VSF-3G.....										2500
VSF-10G.....										2500
AIK-CG.....										2500
MoratenG.....										2500
SchwarzG.....										2500
Edm-ZagrebT.....										2500
RubeovaxG.....										2500
Changchun-47G.....										2500
MeV-IchinoseB95aA.....A.....										2500

	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600	
Edmonston-wt	CAGACGCGAGATTAGCCTCATTGGAACGGAGATCGCGTCTTTATTGACAGGTGGTGCAACCCAATGTGCTCGAAAGTCACCCCTCGGAACCATCAGGGCC										2600
FMS-7										2600
VSF-3										2600
VSF-10										2600
AIK-C										2600
Moraten										2600
Schwarz										2600
Edm-Zagreb										2600
Rubeovax										2600
Changchun-47										2600
MeV-IchinoseB95aG.....										2600

	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700	
Edmonston-wt	AGGTGCACCTGCGGGGAATGTCCCCGAGTGTGTGAGCAATGCCGCACTGATACAGGAGTGGACACCCGAATCTGGTACCACAATCTCCCCGAGATCCCAG										2700
FMS-7	..C.....C.....										2700
VSF-3	..C.....C.....										2700
VSF-10	..C.....C.....										2700
AIK-CA.....										2700
Moraten										2700
Schwarz										2700
Edm-Zagreb										2700
Rubeovax										2700
Changchun-47										2700
MeV-IchinoseB95a										2700

	2710	2720	2730	2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800	
Edmonston-wt	AATAATGAAGAAGGGGAGACTATTATGATGATGAGCTGTTCTCTGATGTCCAAGATATTAAAAACAGCCTTGGCCAAAATACACGAGGATAATCAGAAGA										2800
FMS-7G.....										2800
VSF-3G.....										2800
VSF-10G.....										2800
AIK-C										2800
Moraten										2800
Schwarz										2800
Edm-Zagreb										2800
Rubeovax										2800
Changchun-47A.....										2800
MeV-IchinoseB95aC.....C.C.....										2800

	2810	2820	2830	2840	2850	2860	2870	2880	2890	2900	
Edmonston-wt	TAATCTCCAAGCTAGAATCACTGCTGTTATTGAAGGGAGAAGTTGAGTCAATTAAGAAGCAGATCAACAGGCAAAATATCAGCATATCCACCCTGGAAGG										2900
FMS-7										2900
VSF-3										2900
VSF-10										2900
AIK-C										2900
Moraten										2900
Schwarz										2900
Edm-Zagreb										2900
Rubeovax										2900
Changchun-47										2900
MeV-IchinoseB95aT.....										2900

	2910	2920	2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990	3000	
Edmonston-wt	ACACCTCTCAAGCATCATGATCGCCATTCCTGGACTTGGGAAGGATCCCAACGACCCCACTGCAGATGTCGAAATCAATCCCGACTTGAAACCCATCATA										3000
FMS-7										3000
VSF-3										3000
VSF-10										3000
AIK-C										3000
Moraten										3000
Schwarz										3000
Edm-Zagreb										3000
Rubeovax										3000
Changchun-47										3000
MeV-IchinoseB95aT.....C.....C.....										3000

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          3010      3020      3030      3040      3050      3060      3070      3080      3090      3100
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  GGCAGAGATTCAGGCCGAGCACTGGCCGAAGTTCTCAAGAAACCCGTTGCCAGCCGACAACCTCCAAGGAATGACAAATGGACGGACCAGTTCCAGAGGAC 3100
FMS-7        .....A..... 3100
VSF-3        .....A..... 3100
VSF-10       .....A..... 3100
AIK-C        ..... 3100
Moraten      ..... 3100
Schwarz      ..... 3100
Edm-Zagreb   ..... 3100
Rubeovax     ..... 3100
Changchun-47 ..... 3100
MeV-IchinoseB95a .....G.....G.....T..... 3100

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          3110      3120      3130      3140      3150      3160      3170      3180      3190      3200
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  AGCTGCTGAAGGAATTTTCAGCTAAAGCCGATCGGGAAAAAGATGAGCTCAGCCGTCGGGTTTGTTCCTGACACCGGCCCTGCATCACGCAGTGTAATCCG 3200
FMS-7        ..... 3200
VSF-3        ..... 3200
VSF-10       ..... 3200
AIK-C        .....C..... 3200
Moraten      ..... 3200
Schwarz      ..... 3200
Edm-Zagreb   ..... 3200
Rubeovax     ..... 3200
Changchun-47 ..... 3200
MeV-IchinoseB95a .....A.....G..... 3200

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          3210      3220      3230      3240      3250      3260      3270      3280      3290      3300
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  CTCCATTATAAAATCCAGCCGCTAGAGGAGGATCGGAAGCGTTACCTGATGACTCTCCTTGATGATATCAAAGGAGCCAATGATCTTGCCAAGTTCCAC 3300
FMS-7        ..... 3300
VSF-3        ..... 3300
VSF-10       ..... 3300
AIK-C        ..... 3300
Moraten      ..... 3300
Schwarz      ..... 3300
Edm-Zagreb   ..... 3300
Rubeovax     ..... 3300
Changchun-47 ..... 3300
MeV-IchinoseB95a .....C..... 3300

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
              3310       3320       3330       3340       3350       3360       3370       3380       3390       3400
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  CAGATGCTGATGAAGATAATAATGAAGTAGCTACAGCTCAACTTACCTGCCAACCCCATGCCAGTCGACCCAAGTACAAACCTAAATCCATTATAAAA 3400
FMS-7        ..... 3400
VSF-3        ..... 3400
VSF-10       ..... 3400
AIK-C        ..... 3400
Moraten      ..... 3400
Schwarz      ..... 3400
Edm-Zagreb   ..... 3400
Rubeovax     ..... 3400
Changchun-47 ..... 3400
MeV-IchinoseB95a .....T..T..... 3400

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
              3410       3420       3430       3440       3450       3460       3470       3480       3490       3500
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  AACTTAGGAGCAAAGTGATTGCCTCCCAAGTCCACAATGACAGAGATCTACGACTTCGACAAGTCGGCATGGGACATCAAAGGGTCGATCGCTCCGATA 3500
FMS-7        ..... 3500
VSF-3        ..... 3500
VSF-10       ..... 3500
AIK-C        ..... 3500
Moraten      .....G.....C..... 3500
Schwarz      .....G.....C..... 3500
Edm-Zagreb   .....T..... 3500
Rubeovax     .....C..... 3500
Changchun-47 ..... 3500
MeV-IchinoseB95a .....T.....T..... 3500

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
              3510       3520       3530       3540       3550       3560       3570       3580       3590       3600
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  CAACCCACCACCTACAGTGATGGCAGGCTGGTGCCCCAGGTCAGAGTCATAGATCCTGGTCTAGGCGACAGGAAGGATGAATGCTTTATGTACATGTTTC 3600
FMS-7        ..... 3600
VSF-3        ..... 3600
VSF-10       ..... 3600
AIK-C        .....G.....C..... 3600
Moraten      ..... 3600
Schwarz      ..... 3600
Edm-Zagreb   ..... 3600
Rubeovax     ..... 3600
Changchun-47 ..... 3600
MeV-IchinoseB95a .....T.....T..T..... 3600

```

	3610	3620	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700	
Edmonston-wt	TGCTGGGGGTTGTTGAGGGCAGCGATCCCCTAGGGCCTCCAATCGGGCGAGCATTGGGTCCCTGCCCTTAGGTGTTGGCAGATCCACAGCAAAGCCCGA										3700
FMS-7A.....T.....										3700
VSF-3A.....T.....										3700
VSF-10A.....T.....										3700
AIK-CA.....										3700
MoratenA.....T.....T.....										3700
SchwarzA.....T.....T.....										3700
Edm-ZagrebA.....										3700
RubeovaxA.....T.....										3700
Changchun-47A.....										3700
MeV-IchinoseB95aA.....C.....T.....A.....										3700

	3710	3720	3730	3740	3750	3760	3770	3780	3790	3800	
Edmonston-wt	AGAACTCCTCAAAGAGGCCACTGAGCTTGACATAGTTGTTAGACGTACAGCAGGGCTCAATGAAAACTGGTGTCTACAACAACCCCCACTAACTCTC										3800
FMS-7	.A.....										3800
VSF-3	.A.....										3800
VSF-10	.A.....										3800
AIK-C	.A.....										3800
Moraten	.A.....										3800
Schwarz	.A.....										3800
Edm-Zagreb	.A.....										3800
Rubeovax	.A.....										3800
Changchun-47	.A.....										3800
MeV-IchinoseB95a	G.....C.....										3800

	3810	3820	3830	3840	3850	3860	3870	3880	3890	3900	
Edmonston-wt	CTCACACCTTGAGAAAGGTCCTAACAACAGGGAGTGTCCTCAACGCAAACCAAGTGTGCAATGCGGTTAATCTGATACCGCTCGATACCCCGCAGAGGT										3900
FMS-7										3900
VSF-3										3900
VSF-10										3900
AIK-C										3900
Moraten										3900
Schwarz										3900
Edm-Zagreb										3900
Rubeovax										3900
Changchun-47C.....A.....A.....										3900
MeV-IchinoseB95aT.....A.....G.....C.....										3900

	3910	3920	3930	3940	3950	3960	3970	3980	3990	4000	
Edmonston-wt	TCCGTGTTGTTTATATGAGCATCACCCGCTCTTTCGGATAACGGGTATTACACCGTTCC TAGAAGAATGCTGGAATTCAGATCGGTCAATGCAGTGGCCTT										4000
FMS-7A.....										4000
VSF-3A.....										4000
VSF-10A.....										4000
AIK-C										4000
Moraten										4000
Schwarz										4000
Edm-Zagreb										4000
Rubeovax										4000
Changchun-47										4000
MeV-IchinoseB95aC.....										4000

	4010	4020	4030	4040	4050	4060	4070	4080	4090	4100	
Edmonston-wt	CAACCTGCTGGTGACCCTTAGGATTGACAAGGCGATAGGCCCTGGGAAGATCATCGACAATACAGAGCAACTTCCTGAGGCAACATTTATGGTCCACATC										4100
FMS-7										4100
VSF-3										4100
VSF-10										4100
AIK-C										4100
Moraten										4100
Schwarz										4100
Edm-Zagreb										4100
Rubeovax										4100
Changchun-47A.....										4100
MeV-IchinoseB95aA.....T.....G.....										4100

	4110	4120	4130	4140	4150	4160	4170	4180	4190	4200	
Edmonston-wt	GGGAACCTTCAGGAGAAAGAAGTGAAGTCTACTCTGCCGATTATTGCAAATGAAAATCGAAAAGATGGGCCTGGTTTTTGCACCTGGTGGGATAGGGG										4200
FMS-7T.....T.....										4200
VSF-3T.....T.....										4200
VSF-10T.....T.....										4200
AIK-C										4200
Moraten										4200
Schwarz										4200
Edm-Zagreb										4200
Rubeovax										4200
Changchun-47										4200
MeV-IchinoseB95a										4200

	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+	
	4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300	
Edmonston-wt	GCACCAGTCTTCACATTAGAAAGCACAGGCAAGATGAGCAAGACTCTCCATGCACAACCTCGGGTTCAAGAAGACCTTATGTTACCCGCTGATGGATATCAA	4300
FMS-7A.....A.....	4300
VSF-3A.....A.....	4300
VSF-10A.....A.....	4300
AIK-CA.....	4300
MoratenA.....	4300
SchwarzA.....	4300
Edm-ZagrebA.....A.....	4300
RubeovaxA.....	4300
Changchun-47A.....	4300
MeV-IchinoseB95aA.....A.....	4300

	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+	
	4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400	
Edmonston-wt	TGAAGACCTTAATCGATTACTCTGGAGGAGCAGATGCAAGATAGTAAGAATCCAGGCAGTTTTGCAGCCATCAGTTCCTCAAGAATCCGCATTTACGAC	4400
FMS-7	4400
VSF-3	4400
VSF-10	4400
AIK-C	4400
Moraten	4400
Schwarz	4400
Edm-Zagreb	4400
Rubeovax	4400
Changchun-47	4400
MeV-IchinoseB95aG.....	4400

	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+	
	4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500	
Edmonston-wt	GACGTGATCATAAATGATGACCAAGGACTATTCAAAGTCTGTAGACCGTAGTGCCAGCAATGCCCGAAAACGACCCCTCACAATGACAGCCAGAAG	4500
FMS-7	4500
VSF-3	4500
VSF-10	4500
AIK-C	4500
Moraten	4500
Schwarz	4500
Edm-Zagreb	4500
Rubeovax	4500
Changchun-47	4500
MeV-IchinoseB95aC.....A.....T.....	4500

	4810	4820	4830	4840	4850	4860	4870	4880	4890	4900	
Edmonston-wt	GACCGAGGTGACCCAACCGCAGGCATCCGACTCCCTAGACAGATCCTCTCTCCCGGCAAACTAAACAAAACCTTAGGGCCAAGGAACATACACACCCAAC										4900
FMS-7										4900
VSF-3										4900
VSF-10										4900
AIK-C										4900
Moraten										4900
Schwarz										4900
Edm-Zagreb										4900
Rubeovax										4900
Changchun-47										4900
MeV-IchinoseB95aT.....C.....T.....C.....T.G..										4900
	4910	4920	4930	4940	4950	4960	4970	4980	4990	5000	
Edmonston-wt	AGAACCCAGACCCCGGCCACGGCGCCGCGCCGCCCAACCCCGACAACCAGAGGGAGCCCCCAACCAATCCCGCCGGTTCCTCCCGGTGCCACAGGCAGG										5000
FMS-7C.....										5000
VSF-3C.....										5000
VSF-10C.....										5000
AIK-CC.....										5000
MoratenC.....										5000
SchwarzC.....										5000
Edm-ZagrebC.....										5000
RubeovaxC.....										5000
Changchun-47T.....C.....										5000
MeV-IchinoseB95aG...A.....C.....A.....A.....CC.....T..										5000
	5010	5020	5030	5040	5050	5060	5070	5080	5090	5100	
Edmonston-wt	GACACCAACCCCGAACAGACCCAGCACCCAACCATCGACAATCCAAGACGGGGGGCCCCCAAAAAAAGGCCCCAGGGGCCGACAGCCAGCACCCGC										5100
FMS-7										5100
VSF-3										5100
VSF-10										5100
AIK-CT.....										5100
Moraten										5100
Schwarz										5100
Edm-Zagreb										5100
Rubeovax										5100
Changchun-47										5100
MeV-IchinoseB95a	C.....C.....G...C.....C.....T..										5100

	5110	5120	5130	5140	5150	5160	5170	5180	5190	5200	
Edmonston-wt	GAGGAAGCCCACCCACCCACACACGACCACGGCAACCAACCAGAACCAGACCACCTGGGCCACCAGCTCCCAGACTCGGCCATCACCCCGCAGAAA										5200
FMS-7										5200
VSF-3										5200
VSF-10										5200
AIK-C										5200
Moraten										5200
Schwarz										5200
Edm-Zagreb										5200
Rubeovax										5200
Changchun-47										5200
MeV-IchinoseB95a	A			G		GT				A	5200

	5210	5220	5230	5240	5250	5260	5270	5280	5290	5300	
Edmonston-wt	GGAAAGGCCACAACCCGCGCACCCAGCCCCGATCCGGCGGGGAGCCACCCAACCCGAACCAGCACCCAAGAGCGATCCCCGAAGGACCCCGAACCGCA										5300
FMS-7										5300
VSF-3										5300
VSF-10										5300
AIK-C										5300
Moraten										5300
Schwarz										5300
Edm-Zagreb										5300
Rubeovax										5300
Changchun-47										5300
MeV-IchinoseB95a				C		T		T	GG	A	5300

	5310	5320	5330	5340	5350	5360	5370	5380	5390	5400	
Edmonston-wt	AAGGACATCAGTATCCACAGCCTCTCCAAGTCCCCCGGTCTCCTCCTTTTCTCGAAGGGACCAAAAGATCAATCCACCACCCGACGACACTCAACTC										5400
FMS-7C.....										5400
VSF-3C.....										5400
VSF-10C.....										5400
AIK-CC.....										5400
MoratenC.....										5400
SchwarzC.....										5400
Edm-ZagrebCC.....										5400
Rubeovax	C				C						5400
Changchun-47					C						5400
MeV-IchinoseB95a	A				C			T		T	5400

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          5410      5420      5430      5440      5450      5460      5470      5480      5490      5500
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  CCCACCCCTAAAGGAGACACCCGGGAATCCCAGAATCAAGACTCATCCAATGTCCATCATGGGTCTCAAGGTGAACGTCTCTGCCATATTCATGGCAGTAC  5500
FMS-7         .T.....C.....  5500
VSF-3         .T.....C.....  5500
VSF-10        .T.....C.....  5500
AIK-C         .....  5500
Moraten       .....  5500
Schwarz       .....  5500
Edm-Zagreb    .....  5500
Rubeovax      .....  5500
Changchun-47 .....  5500
MeV-IchinoseB95a .....C.....G.....  5500

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          5510      5520      5530      5540      5550      5560      5570      5580      5590      5600
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  TGTAACTCTCCAGACACCCACCGGTCAAATCCATTGGGGCAATCTCTCTAAGATAGGGGTGGTAGGAATAGGAAGTGCAAGCTACAAAGTTATGACTCG  5600
FMS-7         .....A.....  5600
VSF-3         .....A.....  5600
VSF-10        .....A.....  5600
AIK-C         .....A.....  5600
Moraten       .....A.....  5600
Schwarz       .....A.....  5600
Edm-Zagreb    .....A.....  5600
Rubeovax      .....A.....  5600
Changchun-47 .....A.....  5600
MeV-IchinoseB95a .....A.....G.....  5600

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          5610      5620      5630      5640      5650      5660      5670      5680      5690      5700
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  TTCCAGCCATCAATCATTAGTCATAAAATTAATGCCCAATATAACTCTCCTCAATAACTGCACGAGGGTAGAGATTGCAGAATACAGGAGACTACTGAGA  5700
FMS-7         .....C.....  5700
VSF-3         .....C.....  5700
VSF-10        .....C.....  5700
AIK-C         .....  5700
Moraten       .....  5700
Schwarz       .....  5700
Edm-Zagreb    .....  5700
Rubeovax      .....  5700
Changchun-47 .....  5700
MeV-IchinoseB95a .....G.....C.....  5700

```

	5710	5720	5730	5740	5750	5760	5770	5780	5790	5800	
Edmonston-wt	ACAGTTTTGGAACCAATTAGAGATGCACTTAATGCAATGACCCAGAATATAAGACCGGTTTCAGAGTGTAGCTTCAAGTAGGAGACACAAGAGATTTGCGG										5800
FMS-7G.....										5800
VSF-3G.....										5800
VSF-10G.....										5800
AIK-C										5800
Moraten										5800
Schwarz										5800
Edm-Zagreb										5800
Rubeovax										5800
Changchun-47										5800
MeV-IchinoseB95a										5800
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+											
	5810	5820	5830	5840	5850	5860	5870	5880	5890	5900	
Edmonston-wt	GAGTAGTCCTGGCAGGTGCGGCCCTAGGCGTTGCCACAGCTGCTCAGATAACAGCCGGCATTGCACTTCACCAGTCCATGCTGAACTCTCAAGCCATCGA										5900
FMS-7										5900
VSF-3										5900
VSF-10										5900
AIK-C										5900
Moraten										5900
Schwarz										5900
Edm-Zagreb										5900
Rubeovax										5900
Changchun-47										5900
MeV-IchinoseB95a	...T.....										5900
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+											
	5910	5920	5930	5940	5950	5960	5970	5980	5990	6000	
Edmonston-wt	CAATCTGAGAGCGAGCCTGGAACTACTAATCAGGCAATTGAGGCAATCAGACAAGCAGGGCAGGAGATGATATTGGCTGTTTCAGGGTGTCCAAGACTAC										6000
FMS-7G.....										6000
VSF-3G.....										6000
VSF-10G.....										6000
AIK-C										6000
MoratenA.....										6000
SchwarzA.....										6000
Edm-Zagreb										6000
Rubeovax										6000
Changchun-47T.....										6000
MeV-IchinoseB95aA.....										6000

	6010	6020	6030	6040	6050	6060	6070	6080	6090	6100	
Edmonston-wt	ATCAATAATGAGCTGATACCGTCTATGAACCAACTATCTTGTGATTTAATCGGCCAGAAGCTCGGGCTCAAATTGCTCAGATACTATACAGAAATCCTGT										6100
FMS-7										6100
VSF-3										6100
VSF-10										6100
AIK-C										6100
Moraten										6100
Schwarz										6100
Edm-Zagreb										6100
Rubeovax										6100
Changchun-47										6100
MeV-IchinoseB95aA.....										6100
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+											
	6110	6120	6130	6140	6150	6160	6170	6180	6190	6200	
Edmonston-wt	CATTATTTGGCCCCAGCTTACGGGACCCCATATCTGCGGAGATATCTATCCAGGCTTTGAGCTATGCGCTTGGAGGAGACATCAATAAGGTGTTAGAAAA										6200
FMS-7	.G.....										6200
VSF-3	.G.....										6200
VSF-10	.G.....										6200
AIK-C										6200
MoratenT.....										6200
SchwarzT.....										6200
Edm-Zagreb										6200
RubeovaxT.....										6200
Changchun-47										6200
MeV-IchinoseB95aC.....T.....A.....										6200
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+											
	6210	6220	6230	6240	6250	6260	6270	6280	6290	6300	
Edmonston-wt	GCTCGGATACAGTGGAGGTGATTTACTGGGCATCTTAGAGAGCAGAGGAATAAAGGCCCGATAACTCACGTGACACAGAGTCCTACTTCATTGTCTC										6300
FMS-7										6300
VSF-3										6300
VSF-10										6300
AIK-C										6300
MoratenG.....										6300
SchwarzG.....										6300
Edm-Zagreb										6300
RubeovaxG.....										6300
Changchun-47										6300
MeV-IchinoseB95aA.....										6300

	6310	6320	6330	6340	6350	6360	6370	6380	6390	6400	
Edmonston-wt	AGTATAGCCTATCCGACGCTGTCCGAGATTAAGGGGGTGATTGTCCACCGGCTAGAGGGGGTCTCGTACAACATAGGCTCTCAAGAGTGGTATAACCACTG										6400
FMS-7										6400
VSF-3										6400
VSF-10										6400
AIK-C										6400
Moraten										6400
Schwarz										6400
Edm-Zagreb										6400
Rubeovax										6400
Changchun-47										6400
MeV-IchinoseB95aT.....										6400

	6410	6420	6430	6440	6450	6460	6470	6480	6490	6500	
Edmonston-wt	TGCCCAAGTATGTTGCAACCCAAGGGTACCTTATCTCGAATTTTGATGAGTCATCGTGTACTTTCATGCCAGAGGGGACTGTGTGCAGCCAAAATGCCTT										6500
FMS-7										6500
VSF-3										6500
VSF-10										6500
AIK-C										6500
Moraten										6500
Schwarz										6500
Edm-Zagreb										6500
Rubeovax										6500
Changchun-47A.....										6500
MeV-IchinoseB95a										6500

	6510	6520	6530	6540	6550	6560	6570	6580	6590	6600	
Edmonston-wt	GTACCCGATGAGTCCCTCTGCTCCAAGAATGCCTCCGGGGTCCACCAAGTCCTGTGCTCGTACACTCGTATCCGGGCTTTTGGGAACCGGTTTCATTTTA										6600
FMS-7T.....										6600
VSF-3T.....										6600
VSF-10T.....										6600
AIK-CA.....										6600
MoratenA.....										6600
SchwarzA.....										6600
Edm-Zagreb										6600
RubeovaxA.....										6600
Changchun-47										6600
MeV-IchinoseB95a										6600

	6610	6620	6630	6640	6650	6660	6670	6680	6690	6700	
Edmonston-wt	TCACAAGGGAACCTAATAGCCAATTGTGCATCAATCCTTTGCAAGTGTTACACAACAGGAACGATCATTAATCAAGACCCTGACAAGATCCTAACATACA										6700
FMS-7C.....										6700
VSF-3C.....										6700
VSF-10C.....										6700
AIK-C										6700
Moraten										6700
Schwarz										6700
Edm-Zagreb										6700
Rubeovax										6700
Changchun-47										6700
MeV-IchinoseB95aC.....										6700

	6710	6720	6730	6740	6750	6760	6770	6780	6790	6800	
Edmonston-wt	TTGCTGCCGATCACTGCCCGGTAGTCGAGGTGAACGGCGTGACCATCCAAGTCGGGAGCAGGAGGTATCCAGACGCTGTGTACTTGCACAGAATTGACCT										6800
FMS-7A.....										6800
VSF-3A.....										6800
VSF-10A.....										6800
AIK-CA.....										6800
Moraten										6800
Schwarz										6800
Edm-ZagrebT.....										6800
RubeovaxT.....										6800
Changchun-47										6800
MeV-IchinoseB95aG.....T.....G.....G.....C.....										6800

	6810	6820	6830	6840	6850	6860	6870	6880	6890	6900	
Edmonston-wt	CGGTCTCCCATATCATTGGAGAGGTTGGACGTAGGGACAAATCTGGGGAATGCAATTGCTAAGTTGGAGGATGCCAAGGAATTGTTGGAGTCATCGGAC										6900
FMS-7										6900
VSF-3										6900
VSF-10										6900
AIK-CT.....										6900
Moraten										6900
Schwarz										6900
Edm-Zagreb										6900
Rubeovax										6900
Changchun-47										6900
MeV-IchinoseB95a										6900

	6910	6920	6930	6940	6950	6960	6970	6980	6990	7000	
Edmonston-wt	CAGATATTGAGGAGTATGAAAGGTTTATCGAGCACTAGCATAGTCTACATCCTGATTGCAGTGTGTCTTGGAGGGTTGATAGGGATCCCCGCTTTAATAT										7000
FMS-7										7000
VSF-3										7000
VSF-10										7000
AIK-CT.....										7000
Moraten										7000
Schwarz										7000
Edm-Zagreb										7000
Rubeovax										7000
Changchun-47										7000
MeV-IchinoseB95aT.....										7000
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+											
	7010	7020	7030	7040	7050	7060	7070	7080	7090	7100	
Edmonston-wt	GTTGCTGCAGGGGGCGTTGTAAACAAAAGGGAGAACAAGTTGGTATGTCAAGACCAGGCCTAAAGCCTGATCTTACGGGAACATCAAAATCCTATGTAAG										7100
FMS-7										7100
VSF-3										7100
VSF-10										7100
AIK-C										7100
Moraten										7100
Schwarz										7100
Edm-Zagreb										7100
Rubeovax										7100
Changchun-47										7100
MeV-IchinoseB95aC.....A..G.....										7100
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+											
	7110	7120	7130	7140	7150	7160	7170	7180	7190	7200	
Edmonston-wt	GTCGCTCTGATCCTCTACAACCTTTGAAACACAAATGTCCACAAGTCTCCTCTTCGTCATCAAGCAACCACCGCACCCAGCATCAAGCCACCTGAAAT										7200
FMS-7G.....										7200
VSF-3G.....										7200
VSF-10G.....										7200
AIK-C										7200
Moraten										7200
Schwarz										7200
Edm-Zagreb										7200
Rubeovax										7200
Changchun-47										7200
MeV-IchinoseB95aG..T.....T.....										7200

	7210	7220	7230	7240	7250	7260	7270	7280	7290	7300	
Edmonston-wt	TATCTCCGGCTTCCCTCTGGCCGAACAATATCGGTAGTTAATTAAAACTTAGGGTGCAAGATCATCCACAATGTCACCACAACGAGACCCGGATAAATGCC										7300
FMS-7										7300
VSF-3										7300
VSF-10										7300
AIK-C										7300
MoratenC.....										7300
SchwarzC.....										7300
Edm-Zagreb										7300
Rubeovax										7300
Changchun-47										7300
MeV-IchinoseB95a	.G.		.G.						.A.		7300

	7310	7320	7330	7340	7350	7360	7370	7380	7390	7400	
Edmonston-wt	TTCTACAAAGATAACCCCATCCCAAGGGAAGTAGGATAGTCATTAACAGAGAACATCTTATGATTGATAGACCTTATGTTTGGCTGGCTGTTCTGTTTG										7400
FMS-7										7400
VSF-3										7400
VSF-10										7400
AIK-C										7400
Moraten										7400
Schwarz										7400
Edm-Zagreb										7400
Rubeovax										7400
Changchun-47										7400
MeV-IchinoseB95aC.....	A.....	T.....T.....					A.....	C.....	7400

	7410	7420	7430	7440	7450	7460	7470	7480	7490	7500	
Edmonston-wt	TCATGTCTCTGAGCTTGATCGGGTTGCTAGCCATTGCAGGCATTAGACTTCATCGGGCAGCCATCTACACCGCAGAGATCCATAAAAGCCTCAGCACCAA										7500
FMS-7T.....										7500
VSF-3T.....										7500
VSF-10T.....										7500
AIK-CT.....										7500
MoratenT.....										7500
SchwarzT.....										7500
Edm-ZagrebT.....										7500
RubeovaxT.....										7500
Changchun-47T.....										7500
MeV-IchinoseB95aT.....			C.....T.....		G.....		7500

	7510	7520	7530	7540	7550	7560	7570	7580	7590	7600	
Edmonston-wt	TCTAGATGTAACCTCAATCGAGCATCAGGTCAAGGACGTGCTGACACCACTCTTCAAATCATCGGTGATGAAGTGGGCCTGAGGACACCTCAGAGA										7600
FMS-7T.....										7600
VSF-3T.....										7600
VSF-10T.....										7600
AIK-C										7600
Moraten										7600
Schwarz										7600
Edm-Zagreb										7600
Rubeovax										7600
Changchun-47T.....										7600
MeV-IchinoseB95aG.....G.....T.....										7600
	7610	7620	7630	7640	7650	7660	7670	7680	7690	7700	
Edmonston-wt	TTCACTGACCTAGTGAAATTCATCTCTGACAAGATTAAATTCCTTAATCCGGATAGGGAGTACGACTTCAGAGATCTCACTTGGTGTATCAACCCGCCAG										7700
FMS-7										7700
VSF-3										7700
VSF-10										7700
AIK-C										7700
MoratenA.....										7700
SchwarzA.....										7700
Edm-Zagreb										7700
Rubeovax										7700
Changchun-47A.....										7700
MeV-IchinoseB95aA.....										7700
	7710	7720	7730	7740	7750	7760	7770	7780	7790	7800	
Edmonston-wt	AGAGAATCAAATGGATTATGATCAATACTGTGCAGATGTGGCTGCTGAAGAGCTCATGAATGCATTGGTGAACCTCACTCTACTGGAGACCAGAACAAC										7800
FMS-7C.....A.....										7800
VSF-3C.....A.....										7800
VSF-10C.....A.....										7800
AIK-C										7800
Moraten										7800
Schwarz										7800
Edm-Zagreb										7800
Rubeovax										7800
Changchun-47										7800
MeV-IchinoseB95aA.....G.....GG.....										7800

	7810	7820	7830	7840	7850	7860	7870	7880	7890	7900	
Edmonston-wt	CAATCAGTTCCTAGCTGTCTCAAAGGGAAACTGCTCAGGGCCCACTACAATCAGAGGTCAATTCTCAAACATGTCGCTGTCCTGTTAGACTTGTATTTA										7900
FMS-7										7900
VSF-3										7900
VSF-10										7900
AIK-C										7900
Moraten										7900
Schwarz										7900
Edm-Zagreb										7900
Rubeovax										7900
Changchun-47										7900
MeV-IchinoseB95aG.....										7900

	7910	7920	7930	7940	7950	7960	7970	7980	7990	8000	
Edmonston-wt	AGTCGAGGTTACAATGTGTTCATCTATAGTCACTATGACATCCCAGGGAATGTATGGGGGAACTTACCTAGTGGAAAAGCCTAATCTGAGCAGCAAAAAGGT										8000
FMS-7	G.....										8000
VSF-3	G.....										8000
VSF-10	G.....										8000
AIK-C	G.....										8000
Moraten	G.....										8000
Schwarz	G.....										8000
Edm-Zagreb	G.....										8000
Rubeovax	G.....										8000
Changchun-47	G.....										8000
MeV-IchinoseB95aC.....G.....T...G...										8000

	8010	8020	8030	8040	8050	8060	8070	8080	8090	8100	
Edmonston-wt	CAGAGTTGTCACAACCTGAGCATGTACCGAGTGTGTTGAAGTAGGTGTTATCAGAAATCCGGGTTTGGGGGCTCCGGTGTTCATATGACAAACTATCTTGA										8100
FMS-7										8100
VSF-3										8100
VSF-10										8100
AIK-C										8100
Moraten										8100
Schwarz										8100
Edm-Zagreb										8100
Rubeovax										8100
Changchun-47										8100
MeV-IchinoseB95aC.....G.....T.....										8100

	8110	8120	8130	8140	8150	8160	8170	8180	8190	8200	
Edmonston-wt	GCAACCAGTCAGTAATGATCTCAGCAACTGTATGGTGGCTTTGGGGGAGCTCAAACCTCGCAGCCCTTTGTCCACGGGGAAGATTCTATCACAATTCCTTAT										8200
FMS-7										8200
VSF-3										8200
VSF-10										8200
AIK-CC.....										8200
Moraten										8200
Schwarz										8200
Edm-ZagrebC.....										8200
Rubeovax										8200
Changchun-47										8200
MeV-IchinoseB95aT.....C.....T..T.....C.....A.....										8200

	8210	8220	8230	8240	8250	8260	8270	8280	8290	8300	
Edmonston-wt	CAGGGATCAGGGAAAGGTGTTCAGCTTCCAGCTCGTCAAGCTAGGTGTCTGGAAATCCCCAACCGACATGCAATCCTGGGTCCCCTTATCAACGGATGATC										8300
FMS-7T.....										8300
VSF-3T.....										8300
VSF-10T.....										8300
AIK-CA.....										8300
Moraten										8300
Schwarz										8300
Edm-Zagreb										8300
Rubeovax										8300
Changchun-47										8300
MeV-IchinoseB95aG.....G.....C.....										8300

	8310	8320	8330	8340	8350	8360	8370	8380	8390	8400	
Edmonston-wt	CAGTGATAGACAGGCTTTACCTCTCATCTCACAGAGGTGTTATCGCTGACAATCAAGCAAATGGGCTGTCCCACGACGAAACAGATGACAAGTTGCC										8400
FMS-7										8400
VSF-3										8400
VSF-10										8400
AIK-C										8400
Moraten										8400
Schwarz										8400
Edm-Zagreb										8400
Rubeovax										8400
Changchun-47										8400
MeV-IchinoseB95aT.....G.....										8400

	8410	8420	8430	8440	8450	8460	8470	8480	8490	8500	
Edmonston-wt	AATGGAGACATGCTTCCAACAGGCGTGTAAAGGGTAAAATCCAAGCACTCTGCGAGAATCCCAGAGTGGGCACCATTGAAGGATAACAGGATTCCTTCATAC										8500
FMS-7										8500
VSF-3										8500
VSF-10										8500
AIK-C										8500
Moraten										8500
Schwarz										8500
Edm-Zagreb										8500
Rubeovax										8500
Changchun-47										8500
MeV-IchinoseB95aG.....A.....										8500

	8510	8520	8530	8540	8550	8560	8570	8580	8590	8600	
Edmonston-wt	GGGGTCTTGCTGTTGATCTGAGTCTGACAGTTGAGCTTAAAATCAAATCGCTTCGGGATTCGGGCCATTGATCACACACGGTTCAGGGATGGACCTAT										8600
FMS-7										8600
VSF-3										8600
VSF-10										8600
AIK-C										8600
Moraten										8600
Schwarz										8600
Edm-Zagreb										8600
Rubeovax										8600
Changchun-47										8600
MeV-IchinoseB95aA.....A.....										8600

	8610	8620	8630	8640	8650	8660	8670	8680	8690	8700	
Edmonston-wt	ACAAATCCAACCACAACAATGTGTATTGGCTGACTATCCCGCAATGAAGAACCTAGCCTTAGGTGTAATCAACACATTGGAGTGGATACCGAGATTCAA										8700
FMS-7A.....										8700
VSF-3A.....										8700
VSF-10A.....										8700
AIK-CA.....										8700
Moraten										8700
Schwarz										8700
Edm-Zagreb										8700
Rubeovax										8700
Changchun-47										8700
MeV-IchinoseB95aA.....										8700

	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+	
	8710 8720 8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790 8800	
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+	
Edmonston-wt	GGTTAGTCCCAACCTCTTCACTGTCCCAATTAAGGAAGCAGGCGAAGACTGCCATGCCCAACATACCTACCTGCGGAGGTGGATGGTGATGTCAAACCTC	8800
FMS-7C...T.....G.....	8800
VSF-3C...T.....G.....	8800
VSF-10C...T.....G.....	8800
AIK-CT.....A.....	8800
MoratenT.....	8800
SchwarzT.....	8800
Edm-ZagrebT.....A.....	8800
RubeovaxT.....	8800
Changchun-47T.....A.....	8800
MeV-IchinoseB95aT.....C.....G.....	8800
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+	
	8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880 8890 8900	
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+	
Edmonston-wt	AGTTCCAATCTGGTGATTCTACCTGGTCAAGATCTCCAATATGTTTTGGCAACCTACGATACTTCCAGGGTTGAACATGCTGTGGTTTTATTACGTTTACA	8900
FMS-7	8900
VSF-3	8900
VSF-10	8900
AIK-C	8900
Moraten	8900
Schwarz	8900
Edm-Zagreb	8900
Rubeovax	8900
Changchun-47	8900
MeV-IchinoseB95aA.....G.....T.....	8900
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+	
	8910 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990 9000	
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+	
Edmonston-wt	GCCCAGCCGCTCATTCTTACTTTTATCCTTTTAGGTTGCCTATAAAGGGGTCCCCATCGAATTACAAGTGGAATGCTTCACATGGGACCAAAAACCT	9000
FMS-7A.....	9000
VSF-3A.....	9000
VSF-10A.....	9000
AIK-CA.....	9000
MoratenA.....	9000
SchwarzA.....	9000
Edm-Zagreb	9000
RubeovaxA.....	9000
Changchun-47A.....G.....	9000
MeV-IchinoseB95aA.....A.....A.....	9000


```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          9010      9020      9030      9040      9050      9060      9070      9080      9090      9100
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  CTGGTGCCGTCACCTTCTGTGTGCTTGCGGACTCAGAATCTGGTGGACATATCACTCACTCTGGGATGGTGGGCATGGGAGTCAGCTGCACAGTCACCCGG  9100
FMS-7         .....A.....A.....  9100
VSF-3         .....A.....A.....  9100
VSF-10        .....A.....A.....  9100
AIK-C         .....  9100
Moraten       .....  9100
Schwarz       .....  9100
Edm-Zagreb    .....  9100
Rubeovax      .....  9100
Changchun-47 .....  9100
MeV-IchinoseB95a .....T.....  9100

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          9110      9120      9130      9140      9150      9160      9170      9180      9190      9200
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  GAAGATGGAACCAATCGCAGATAGGGCTGCTAGTGAACCAATCACATGATGTCACCCAGACATCAGGCATACCCACTAGTGTGAAATAGACATCAGAATT  9200
FMS-7         .....  9200
VSF-3         .....  9200
VSF-10        .....  9200
AIK-C         .....T...T.....  9200
Moraten       .....  9200
Schwarz       .....  9200
Edm-Zagreb    .....T.....  9200
Rubeovax      .....  9200
Changchun-47 .....T.....  9200
MeV-IchinoseB95a .....C...G.....  9200

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          9210      9220      9230      9240      9250      9260      9270      9280      9290      9300
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  AAGAAAAACGTAGGGTCCAAGTGGTTCCCCGTTATGGACTCGCTATCTGTCAACCAGATCTTATACCCTGAAGTTCACCTAGATAGCCCGATAGTTACCA  9300
FMS-7         .....  9300
VSF-3         .....  9300
VSF-10        .....  9300
AIK-C         .....  9300
Moraten       .....  9300
Schwarz       .....  9300
Edm-Zagreb    .....  9300
Rubeovax      .....  9300
Changchun-47 .....  9300
MeV-IchinoseB95a .....T.....  9300

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          9310      9320      9330      9340      9350      9360      9370      9380      9390      9400
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  ATAAGATAGTAGCCATCCTGGAGTATGCTCGAGTCCCTCACGCTTACAGCCTGGAGGACCCTACACTGTGTCAGAACATCAAGCACCGCCTAAAAAACGG  9400
FMS-7        .....  9400
VSF-3        .....  9400
VSF-10       .....  9400
AIK-C        .....  9400
Moraten      .....  9400
Schwarz      .....  9400
Edm-Zagreb   .....  9400
Rubeovax     .....  9400
Changchun-47 .....  9400
MeV-IchinoseB95a .....T.....  9400

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          9410      9420      9430      9440      9450      9460      9470      9480      9490      9500
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  ATTTTCCAACCAAATGATTATAAACAATGTGGAAGTTGGGAATGTCATCAAGTCCAAGCTTAGGAGTTATCCGGCCCACTCTCATATTCCATATCCAAAT  9500
FMS-7        .....  9500
VSF-3        .....  9500
VSF-10       .....  9500
AIK-C        .....  9500
Moraten      .....  9500
Schwarz      .....  9500
Edm-Zagreb   .....  9500
Rubeovax     .....  9500
Changchun-47 .....  9500
MeV-IchinoseB95a ...C.....  9500

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          9510      9520      9530      9540      9550      9560      9570      9580      9590      9600
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  TGTAAATCAGGATTTATTTAACATAGAAGACAAAGAGTCAACGAGGAAGATCCGTGAACTCCTCAAAAAGGGGAATTTCGCTGTACTCCAAAGTCAGTGATA  9600
FMS-7        .....  9600
VSF-3        .....  9600
VSF-10       .....  9600
AIK-C        .....  9600
Moraten      .....  9600
Schwarz      .....  9600
Edm-Zagreb   .....  9600
Rubeovax     .....  9600
Changchun-47 .....  9600
MeV-IchinoseB95a .....A.....G.....A.....A.....  9600

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          9610      9620      9630      9640      9650      9660      9670      9680      9690      9700
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  AGGTTTTCCAATGCTTAAGGGACACTAACTCACGGCTTGGCCTAGGCTCCGAATTGAGGGAGGACATCAAGGAGAAAGTTATTAAGTTGGGAGTTTACAT  9700
FMS-7         ..... 9700
VSF-3         ..... 9700
VSF-10        ..... 9700
AIK-C         ..... 9700
Moraten       ..... 9700
Schwarz       ..... 9700
Edm-Zagreb    ..... 9700
Rubeovax      ..... 9700
Changchun-47  ..... 9700
MeV-IchinoseB95a ..... C.G. .... A. .... 9700

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          9710      9720      9730      9740      9750      9760      9770      9780      9790      9800
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  GCACAGCTCCCAGTGGTTTGAGCCCTTCTGTTTTGGTTTACAGTCAAGACTGAGATGAGGTCAGTGATTAAATCACAACCATACTTGCCATAGGAGG  9800
FMS-7         ..... 9800
VSF-3         ..... 9800
VSF-10        ..... 9800
AIK-C         ..... 9800
Moraten       ..... 9800
Schwarz       ..... 9800
Edm-Zagreb    ..... 9800
Rubeovax      ..... 9800
Changchun-47  ..... 9800
MeV-IchinoseB95a ..... A. .... 9800

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          9810      9820      9830      9840      9850      9860      9870      9880      9890      9900
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  AGACACACACCTGTATTCTTCACTGGTAGTTCAGTTGAGTTGCTAATCTCTCGTGACCTTGTGCTATAATCAGTAAAGAGTCTCAACATGTATATTACC  9900
FMS-7         ..... G. .... A. .... 9900
VSF-3         ..... G. .... A. .... 9900
VSF-10        ..... G. .... A. .... 9900
AIK-C         ..... 9900
Moraten       ..... 9900
Schwarz       ..... 9900
Edm-Zagreb    ..... 9900
Rubeovax      ..... 9900
Changchun-47  ..... 9900
MeV-IchinoseB95a ..... C. T. .... G. .... 9900

```

	9910	9920	9930	9940	9950	9960	9970	9980	9990	10000	
Edmonston-wt	TGACATTTGAACTGGTTTTGATGTATTGTGATGTCATAGAGGGGAGGTTAATGACAGAGACCCGCTATGACTATTGATGCTAGGTATACAGAGCTTCTAGG										10000
FMS-7G.....										10000
VSF-3G.....										10000
VSF-10G.....										10000
AIK-C										10000
Moraten										10000
Schwarz										10000
Edm-Zagreb										10000
Rubeovax										10000
Changchun-47										10000
MeV-IchinoseB95a	...G.....C.....G...A.....										10000

	10010	10020	10030	10040	10050	10060	10070	10080	10090	10100	
Edmonston-wt	AAGAGTCAGATACATGTGGAACTGATAGATGGTTTCTTCCCTGCACTCGGGAATCCAACCTTATCAAATTGTAGCCATGCTGGAGCCTCTTCACTTGCT										10100
FMS-7										10100
VSF-3										10100
VSF-10										10100
AIK-C										10100
Moraten										10100
Schwarz										10100
Edm-Zagreb										10100
Rubeovax										10100
Changchun-47										10100
MeV-IchinoseB95aA.....										10100

	10110	10120	10130	10140	10150	10160	10170	10180	10190	10200	
Edmonston-wt	TACCTGCAGCTGAGGGATATAACAGTAGAACTCAGAGGTGCTTTCCTTAACCACTGCTTTACTGAAATACATGATGTTCTTGACAAAACGGGTTTTCTG										10200
FMS-7										10200
VSF-3										10200
VSF-10										10200
AIK-C										10200
Moraten										10200
Schwarz										10200
Edm-Zagreb										10200
Rubeovax										10200
Changchun-47										10200
MeV-IchinoseB95a	...A.....										10200

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      10210      10220      10230      10240      10250      10260      10270      10280      10290      10300
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt ATGAAGGTACTTATCATGAGTTAATTGAAGCTCTAGATTACATTTTCATAACTGATGACATACATCTGACAGGGGAGATTTTCTCATTTTTCAGAAGTTT 10300
FMS-7 ..... 10300
VSF-3 ..... 10300
VSF-10 ..... 10300
AIK-C ..... 10300
Moraten ..... C ..... 10300
Schwarz ..... C ..... 10300
Edm-Zagreb ..... 10300
Rubeovax ..... 10300
Changchun-47 ..... 10300
MeV-IchinoseB95a ..... C ..... 10300

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      10310      10320      10330      10340      10350      10360      10370      10380      10390      10400
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt CGGCCACCCCAGACTTGAAGCAGTAACGGCTGCTGAAAATGTTAGGAAATACATGAATCAGCCTAAAGTCATTGTGTATGAGACTCTGATGAAAGGTCAT 10400
FMS-7 ..... 10400
VSF-3 ..... 10400
VSF-10 ..... 10400
AIK-C ..... 10400
Moraten ..... 10400
Schwarz ..... 10400
Edm-Zagreb ..... 10400
Rubeovax ..... 10400
Changchun-47 ..... 10400
MeV-IchinoseB95a ..... C ..... 10400

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      10410      10420      10430      10440      10450      10460      10470      10480      10490      10500
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt GCCATATTTTGTGGAATCATAATCAACGGCTATCGTGACAGGCACGGAGGAGTTGGCCACCGCTGACCCTCCCCCTGCATGCTGCAGACACAATCCGGA 10500
FMS-7 ..... 10500
VSF-3 ..... 10500
VSF-10 ..... 10500
AIK-C ..... 10500
Moraten ..... 10500
Schwarz ..... 10500
Edm-Zagreb ..... 10500
Rubeovax ..... 10500
Changchun-47 ..... 10500
MeV-IchinoseB95a ..... C ..... 10500

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          10510   10520   10530   10540   10550   10560   10570   10580   10590   10600
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  ATGCTCAAGCTTCAGGTGAAGGGTTAACACATGAGCAGTGCCTTGATAACTGGAAATCTTTTGCTGGAGTGAAATTTGGCTGCTTTATGCCTCTTAGCCT 10600
FMS-7        .....
VSF-3        .....
VSF-10       .....
AIK-C        .....
Moraten      .....
Schwarz      .....
Edm-Zagreb   .....G.....
Rubeovax     .....
Changchun-47 .....
MeV-IchinoseB95a .....A.....G.....T.....

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          10610   10620   10630   10640   10650   10660   10670   10680   10690   10700
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  GGATAGTGATCTGACAATGTACCTAAAGGACAAGGCACCTTGCTGCTCTCCAAAGGGAATGGGATTCAGTTTACCCGAAAGAGTTCCTGCGTTACGACCCT 10700
FMS-7        .....
VSF-3        .....
VSF-10       .....
AIK-C        .....
Moraten      .....
Schwarz      .....
Edm-Zagreb   .....
Rubeovax     .....
Changchun-47 .....
MeV-IchinoseB95a ...C.....T.....

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          10710   10720   10730   10740   10750   10760   10770   10780   10790   10800
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  CCAAGGGAACCGGGTCACGGAGGCTTGTAGATGTTTTCTTAATGATTCGAGCTTTGACCCATATGATGTGATAATGTATGTTGTAAGTGGAGCTTACC 10800
FMS-7        .....
VSF-3        .....
VSF-10       .....
AIK-C        .....
Moraten      .....
Schwarz      .....
Edm-Zagreb   .....
Rubeovax     .....
Changchun-47 .....C.....
MeV-IchinoseB95a .....A.....C.....C.....

```

	10810	10820	10830	10840	10850	10860	10870	10880	10890	10900	
Edmonston-wt	TCCATGACCCTGAGTTCAACCTGTCTTACAGCCTGAAAGAAAAGGAGATCAAGGAAACAGGTAGACTTTTTCCTAAAATGACTTACAAAATGAGGGCATG										10900
FMS-7										10900
VSF-3										10900
VSF-10										10900
AIK-C										10900
Moraten										10900
Schwarz										10900
Edm-Zagreb										10900
Rubeovax										10900
Changchun-47										10900
MeV-IchinoseB95aC.....										10900

	10910	10920	10930	10940	10950	10960	10970	10980	10990	11000	
Edmonston-wt	CCAAGTGATTGCTGAAAATCTAATCTCAAACGGGATTGGCAAATATTTTAAGGACAATGGGATGGCCAAGGATGAGCACGATTTGACTAAGGCACTCCAC										11000
FMS-7										11000
VSF-3										11000
VSF-10										11000
AIK-C										11000
Moraten										11000
Schwarz										11000
Edm-Zagreb										11000
Rubeovax										11000
Changchun-47										11000
MeV-IchinoseB95aC.....G.....										11000

	11010	11020	11030	11040	11050	11060	11070	11080	11090	11100	
Edmonston-wt	ACTCTAGCTGTCTCAGGAGTCCCAAAGATCTCAAAGAAAGTCACAGGGGGGGCCAGTCTTAAAAACCTACTCCCGAAGCCCAGTCCACACAAGTACCA										11100
FMS-7										11100
VSF-3										11100
VSF-10										11100
AIK-C										11100
Moraten										11100
Schwarz										11100
Edm-Zagreb										11100
Rubeovax										11100
Changchun-47										11100
MeV-IchinoseB95aG.....										11100

	11110	11120	11130	11140	11150	11160	11170	11180	11190	11200	
Edmonston-wt	GGAACGTGAGAGCAGCAAAAGGGTTTATAGGGTTCCTCAAGTAATTCGGCAGGACCAAGACACTGATCATCCGGAGAATATGGAAGCTTACGAGACAGT										11200
FMS-7										11200
VSF-3										11200
VSF-10										11200
AIK-C										11200
Moraten										11200
Schwarz										11200
Edm-Zagreb										11200
Rubeovax										11200
Changchun-47										11200
MeV-IchinoseB95aT.A.....A.....G...A.....T.....A.T.....A...A.C.....										11200
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----											
	11210	11220	11230	11240	11250	11260	11270	11280	11290	11300	
Edmonston-wt	CAGTGCATTTATCAGACTGATCTCAAGAAGTACTGCCTTAATTGGAGATATGAGACCATCAGCTTGTTCACAGAGGCTAAATGAGATTTACGGATTG										11300
FMS-7										11300
VSF-3										11300
VSF-10										11300
AIK-C										11300
Moraten										11300
Schwarz										11300
Edm-Zagreb										11300
Rubeovax										11300
Changchun-47										11300
MeV-IchinoseB95a	...C.....A.....A.....										11300
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----											
	11310	11320	11330	11340	11350	11360	11370	11380	11390	11400	
Edmonston-wt	CCCTCATTTTTCCAGTGGCTGCATAAGAGGCTTGAGACCTCTGTCTGTATGTAAGTGACCCTCATTGCCCCCGACCTTGACGCCCATATCCC GTTAT										11400
FMS-7										11400
VSF-3										11400
VSF-10										11400
AIK-C										11400
Moraten										11400
Schwarz										11400
Edm-Zagreb										11400
Rubeovax										11400
Changchun-47C.....										11400
MeV-IchinoseB95aT.....A.....C.....G.....										11400


```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          11410      11420      11430      11440      11450      11460      11470      11480      11490      11500
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt ATAAAGTCCCAATGATCAAATCTTCATTAAGTACCCTATGGGAGGTATAGAAGGGTATTGTCAGAAGCTGTGGACCATCAGCACCATTCCCTATCTATA 11500
FMS-7        C..... 11500
VSF-3        C..... 11500
VSF-10       C..... 11500
AIK-C        ..... 11500
Moraten      ..... 11500
Schwarz      ..... 11500
Edm-Zagreb   ..... 11500
Rubeovax     ..... 11500
Changchun-47 ..... 11500
MeV-IchinoseB95a GC.....C.....C.....CT.... 11500

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          11510      11520      11530      11540      11550      11560      11570      11580      11590      11600
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt CCTGGCTGCTTATGAGAGCGGAGTAAGGATTGCTTCGTTAGTGCAAGGGGACAATCAGACCATAGCCGTAACAAAAAGGGTACCCAGCACATGGCCCTAC 11600
FMS-7        ..... 11600
VSF-3        ..... 11600
VSF-10       ..... 11600
AIK-C        ..... 11600
Moraten      ..... 11600
Schwarz      ..... 11600
Edm-Zagreb   ..... 11600
Rubeovax     ..... 11600
Changchun-47 ..... 11600
MeV-IchinoseB95a .....G.....T.... 11600

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          11610      11620      11630      11640      11650      11660      11670      11680      11690      11700
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt AACCTTAAGAAACGGGAAGCTGCTAGAGTAACTAGAGATTACTTTGTAATTCTTAGGCAAAGGCTACATGATATTGGCCATCACCTCAAGGCAAATGAGA 11700
FMS-7        ..... 11700
VSF-3        ..... 11700
VSF-10       ..... 11700
AIK-C        ..... 11700
Moraten      ..... 11700
Schwarz      ..... 11700
Edm-Zagreb   ..... 11700
Rubeovax     ..... 11700
Changchun-47 ..... 11700
MeV-IchinoseB95a .....C..... 11700

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          11710   11720   11730   11740   11750   11760   11770   11780   11790   11800
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt CAATTGTTTCATCACATTTTGTCTATTCAAAGGAATATATTATGATGGGCTACTTGTGTCCCAATCACTCAAGAGCATCGCAAGATGTGTATTCTG 11800
FMS-7        ..... 11800
VSF-3        ..... 11800
VSF-10       ..... 11800
AIK-C        ..... 11800
Moraten      ..... 11800
Schwarz      ..... 11800
Edm-Zagreb   ..... 11800
Rubeovax     ..... 11800
Changchun-47 ..... 11800
MeV-IchinoseB95a ..... 11800

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          11810   11820   11830   11840   11850   11860   11870   11880   11890   11900
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt GTCAGAGACTATAGTTGATGAAACAAGGGCAGCATGCAGTAATATTGCTACAACAATGGCTAAAAGCATCGAGAGAGGTTATGACCGTTACCTTGCATAT 11900
FMS-7        ..... 11900
VSF-3        ..... 11900
VSF-10       ..... 11900
AIK-C        ..... 11900
Moraten      ..... 11900
Schwarz      ..... 11900
Edm-Zagreb   ..... 11900
Rubeovax     ..... 11900
Changchun-47 ..... 11900
MeV-IchinoseB95a ..... 11900

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          11910   11920   11930   11940   11950   11960   11970   11980   11990   12000
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt TCCCTGAACGTCCTAAAAGTGATACAGCAAATCTGATCTCTTTGGCTTACAATCAATCAACCATGACCCGGGATGTAGTCATACCCCTCCTCACAA 12000
FMS-7        ..... 12000
VSF-3        ..... 12000
VSF-10       ..... 12000
AIK-C        ..... 12000
Moraten      ..... 12000
Schwarz      ..... 12000
Edm-Zagreb   ..... 12000
Rubeovax     ..... 12000
Changchun-47 ..... 12000
MeV-IchinoseB95a ..... 12000

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      12010      12020      12030      12040      12050      12060      12070      12080      12090      12100
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt ACAACGACCTCTTAATAAGGATGGCACTGTTGCCCGCTCCTATTGGGGGGATGAATTATCTGAATATGAGCAGGCTGTTTGTTCAGAAACATCGGTGATCC 12100
FMS-7          ..... 12100
VSF-3          ..... 12100
VSF-10         ..... 12100
AIK-C          ..... 12100
Moraten        ..... 12100
Schwarz        ..... 12100
Edm-Zagreb     ..... 12100
Rubeovax       ..... 12100
Changchun-47  ..... 12100
MeV-IchinoseB95a .....T..... 12100

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      12110      12120      12130      12140      12150      12160      12170      12180      12190      12200
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt AGTAACATCATCAATTGCTGATCTCAAGAGAATGATTCTCGCCTCACTAATGCCTGAAGAGACCCTCCATCAAGTAATGACACAACAACCGGGGACTCT 12200
FMS-7          ..... 12200
VSF-3          ..... 12200
VSF-10         ..... 12200
AIK-C          ..... 12200
Moraten        ..... 12200
Schwarz        ..... 12200
Edm-Zagreb     ..... 12200
Rubeovax       ..... 12200
Changchun-47  ..... 12200
MeV-IchinoseB95a .....A..... 12200

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      12210      12220      12230      12240      12250      12260      12270      12280      12290      12300
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt TCATTCTAGACTGGGCTAGCGACCCTTACTCAGCAAATCTGTATGTGTCCAGAGCATCACTAGACTCCTCAAGAACATAACTGCAAGGTTTGTCTCTGA 12300
FMS-7          ..... 12300
VSF-3          ..... 12300
VSF-10         ..... 12300
AIK-C          ..... 12300
Moraten        ..... 12300
Schwarz        ..... 12300
Edm-Zagreb     ..... 12300
Rubeovax       ..... 12300
Changchun-47  ..... 12300
MeV-IchinoseB95a .....C.....A..... 12300

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          12310      12320      12330      12340      12350      12360      12370      12380      12390      12400
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  TCCATAGTCCAAACCCAATGTTAAAAGGATTATTCCATGATGACAGTAAAGAAGAGGACGAGGGACTGGCGGCATTCTCATGGACAGGCATATTATAGT 12400
FMS-7        ..... 12400
VSF-3        ..... 12400
VSF-10       ..... 12400
AIK-C        ..... 12400
Moraten      ..... 12400
Schwarz      ..... 12400
Edm-Zagreb   ..... 12400
Rubeovax     ..... 12400
Changchun-47 .....C..... 12400
MeV-IchinoseB95a .....G.....A..... 12400

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          12410      12420      12430      12440      12450      12460      12470      12480      12490      12500
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  ACCTAGGGCAGCTCATGAAATCCTGGATCATAGTGTACAGGGGCAAGAGAGTCTATTGCAGGCATGCTGGATACCACAAAAGGCCTGATTCGAGCCAGC 12500
FMS-7        .....T..... 12500
VSF-3        .....T..... 12500
VSF-10       .....T..... 12500
AIK-C        ..... 12500
Moraten      .....T..... 12500
Schwarz      .....T..... 12500
Edm-Zagreb   ..... 12500
Rubeovax     .....T..... 12500
Changchun-47 ..... 12500
MeV-IchinoseB95a .....A..... 12500

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          12510      12520      12530      12540      12550      12560      12570      12580      12590      12600
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  ATGAGGAAGGGGGGTTAACCTCTCGAGTGATAACCAGATTGTCCAATTATGACTATGAACAATTCAGAGCAGGGATGGTGCTATTGACAGGAAGAAAGA 12600
FMS-7        ...AA..... 12600
VSF-3        ...AA..... 12600
VSF-10       ...AA..... 12600
AIK-C        ..... 12600
Moraten      ..... 12600
Schwarz      ..... 12600
Edm-Zagreb   ..... 12600
Rubeovax     .....C..... 12600
Changchun-47 .....A..... 12600
MeV-IchinoseB95a .....T..... 12600

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      12610      12620      12630      12640      12650      12660      12670      12680      12690      12700
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  GAAATGTCCTCATTGACAAAGAGTCATGTTTCAGTGCAGCTGGCGAGAGCTCTAAGAAGCCATATGTGGGCGAGGCTAGCTCGAGGACGGCCTATTTACGG 12700
FMS-7        ..... 12700
VSF-3        ..... 12700
VSF-10       ..... 12700
AIK-C        ..... 12700
Moraten      ..... 12700
Schwarz      ..... 12700
Edm-Zagreb   ..... 12700
Rubeovax     ..... 12700
Changchun-47 ..... 12700
MeV-IchinoseB95a .....T...C.....A..A..... 12700

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      12710      12720      12730      12740      12750      12760      12770      12780      12790      12800
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  CCTTGAGGTCCTGATGTACTAGAAATCTATGCGAGGCCACCTTATTCGGCGTCATGAGACATGTGTCATCTGCCAGTGTGGATCAGTCAACTACGGATGG 12800
FMS-7        ..... 12800
VSF-3        ..... 12800
VSF-10       ..... 12800
AIK-C        ..... 12800
Moraten      ..... 12800
Schwarz      ..... 12800
Edm-Zagreb   ..... 12800
Rubeovax     ..... 12800
Changchun-47 ..... 12800
MeV-IchinoseB95a ..... 12800

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      12810      12820      12830      12840      12850      12860      12870      12880      12890      12900
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  TTTTTGTCCCTCGGGTTGCCAACTGGATGATATTGACAAGGAAACATCATCCTTGAGAGTCCCATATATTGGTTCTACCACTGATGAGAGAACAGACA 12900
FMS-7        ..... 12900
VSF-3        ..... 12900
VSF-10       ..... 12900
AIK-C        ..... 12900
Moraten      ..... 12900
Schwarz      ..... 12900
Edm-Zagreb   ..... 12900
Rubeovax     ..... 12900
Changchun-47 ..... 12900
MeV-IchinoseB95a ..... 12900

```

	12910	12920	12930	12940	12950	12960	12970	12980	12990	13000		
Edmonston-wt	TGAAGCTTGCCTTCGTAAGAGCCCAAGTCGATCCTTGCGATCTGCTGTTAGAATAGCAACAGTGTACTCATGGGCTTACGGTGATGATGATAGCTCTTG										13000	
FMS-7										13000	
VSF-3										13000	
VSF-10										13000	
AIK-C										13000	
Moraten										13000	
Schwarz										13000	
Edm-Zagreb										13000	
Rubeovax										13000	
Changchun-47										13000	
MeV-IchinoseB95aC.....A.....C.....								13000

	13010	13020	13030	13040	13050	13060	13070	13080	13090	13100		
Edmonston-wt	GAACGAAGCCTGGTTGTTGGCTAGGCCAAAGGGCCAATGTGAGCCTGGAGGAGCTAAGGGTGATCACTCCCATCTCAACTTCGACTAATTTAGCGCATAGG										13100	
FMS-7										13100	
VSF-3										13100	
VSF-10										13100	
AIK-C										13100	
Moraten										13100	
Schwarz										13100	
Edm-Zagreb										13100	
Rubeovax										13100	
Changchun-47										13100	
MeV-IchinoseB95aA.....					G.....				13100

	13110	13120	13130	13140	13150	13160	13170	13180	13190	13200		
Edmonston-wt	TTGAGGGATCGTAGCACTCAAGTGAAATACTCAGGTACATCCCTTGTCCGAGTGGCGAGGTATACCACAATCTCCAACGACAATCTCTCATTTGTCATAT										13200	
FMS-7										13200	
VSF-3										13200	
VSF-10										13200	
AIK-C										13200	
Moraten										13200	
Schwarz										13200	
Edm-Zagreb										13200	
Rubeovax										13200	
Changchun-47										13200	
MeV-IchinoseB95a				A.....						13200

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          13210      13220      13230      13240      13250      13260      13270      13280      13290      13300
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt CAGATAAGAAGGTTGATACTAACTTTATATACCAACAAGGAATGCTTCTAGGGTTGGGTGTTTTAGAAACATTGTTTCGACTCGAGAAAAGATACCGGATC 13300
FMS-7          .....C..... 13300
VSF-3          .....C..... 13300
VSF-10         .....C..... 13300
AIK-C          ..... 13300
Moraten        ..... 13300
Schwarz        ..... 13300
Edm-Zagreb     ..... 13300
Rubeovax       ..... 13300
Changchun-47   ..... 13300
MeV-IchinoseB95a .....T..... 13300

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          13310      13320      13330      13340      13350      13360      13370      13380      13390      13400
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt ATCTAACACGGTATTACATCTTCACGTCGAAACAGATTGTTGCGTGATCCCGATGATAGATCATCCCAGGATACCCAGCTCCCGCAAGCTAGAGCTGAGG 13400
FMS-7          ..... 13400
VSF-3          ..... 13400
VSF-10         ..... 13400
AIK-C          ..... 13400
Moraten        ..... 13400
Schwarz        ..... 13400
Edm-Zagreb     ..... 13400
Rubeovax       ..... 13400
Changchun-47   ..... 13400
MeV-IchinoseB95a ..... 13400

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          13410      13420      13430      13440      13450      13460      13470      13480      13490      13500
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt GCAGAGCTATGTACCAACCCATTGATATATGATAATGCACCTTTAATTGACAGAGATGCAACAAGGCTATACACCCAGAGCCATAGGAGGCACCTTGTGG 13500
FMS-7          ..... 13500
VSF-3          ..... 13500
VSF-10         ..... 13500
AIK-C          .....A..... 13500
Moraten        ..... 13500
Schwarz        ..... 13500
Edm-Zagreb     .....A..... 13500
Rubeovax       ..... 13500
Changchun-47   .....A..... 13500
MeV-IchinoseB95a ..... 13500

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          13510      13520      13530      13540      13550      13560      13570      13580      13590      13600
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  AATTTGTTACATGGTCCACACCCCAACTATATCACATTTTAGCTAAGTCCACAGCACTATCTATGATTGACCTGGTAACAAAATTTGAGAAGGACCATAT 13600
FMS-7        ..... 13600
VSF-3        ..... 13600
VSF-10       ..... 13600
AIK-C        ..... 13600
Moraten      ..... 13600
Schwarz      ..... 13600
Edm-Zagreb   ..... 13600
Rubeovax     ..... 13600
Changchun-47 ..... 13600
MeV-IchinoseB95a .....C..... 13600

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          13610      13620      13630      13640      13650      13660      13670      13680      13690      13700
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  GAATGAAATTTTCAGCTCTCATAGGGGATGACGATATCAATAGTTTCATAACTGAGTTTCTGCTCATAGAGCCAAGATTATTCACTATCTACTTGGGCCAG 13700
FMS-7        ..... 13700
VSF-3        ..... 13700
VSF-10       ..... 13700
AIK-C        ..... 13700
Moraten      ..... 13700
Schwarz      ..... 13700
Edm-Zagreb   ..... 13700
Rubeovax     ..... 13700
Changchun-47 ..... 13700
MeV-IchinoseB95a .....T.....C..... 13700

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          13710      13720      13730      13740      13750      13760      13770      13780      13790      13800
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  TGTGCGGCCATCAATTGGGCATTTGATGTACATTATCATAGACCATCAGGAAATATCAGATGGGTGAGCTGTTGTTCATCGTTCCTTTCTAGAATGAGCA 13800
FMS-7        ..... 13800
VSF-3        ..... 13800
VSF-10       ..... 13800
AIK-C        ..... 13800
Moraten      ..... 13800
Schwarz      ..... 13800
Edm-Zagreb   ..... 13800
Rubeovax     ..... 13800
Changchun-47 ..... 13800
MeV-IchinoseB95a .....A.....T..... 13800

```


	13810	13820	13830	13840	13850	13860	13870	13880	13890	13900	
Edmonston-wt	AAGGAGTGTTTAAGGTGCTTGTCAATGCTCTAAGCCACCCAAAGATCTACAAGAAATTCTGGCATTGTGGTATTATAGAGCCTATCCATGGTCCTTCACT										13900
FMS-7										13900
VSF-3										13900
VSF-10										13900
AIK-C										13900
Moraten										13900
Schwarz										13900
Edm-Zagreb										13900
Rubeovax										13900
Changchun-47										13900
MeV-IchinoseB95a										13900

	13910	13920	13930	13940	13950	13960	13970	13980	13990	14000	
Edmonston-wt	TGATGCTCAAAACTTGCACACAACCTGTGTGCAACATGGTTTACACATGCTATATGACCTACCTCGACCTGTTGTTGAATGAAGAGTTAGAAGAGTTTACA										14000
FMS-7										14000
VSF-3										14000
VSF-10										14000
AIK-C										14000
Moraten										14000
Schwarz										14000
Edm-Zagreb										14000
Rubeovax										14000
Changchun-47										14000
MeV-IchinoseB95a										14000

	14010	14020	14030	14040	14050	14060	14070	14080	14090	14100	
Edmonston-wt	TTTCTCTTGTGTGAAAGCGACGAGGATGTAGTACCGGACAGATTCGACAACATCCAGGCAAAACACTTATGTGTTCTGGCAGATTTGTACTGTCAACCAG										14100
FMS-7										14100
VSF-3										14100
VSF-10										14100
AIK-C										14100
Moraten										14100
Schwarz										14100
Edm-Zagreb										14100
Rubeovax										14100
Changchun-47										14100
MeV-IchinoseB95a	T	T					G				14100

	14110	14120	14130	14140	14150	14160	14170	14180	14190	14200	
Edmonston-wt	GGACCTGCCACCAATTCGAGGTCTAAGACCCGGTAGAGAAATGTGCAGTTCTAACCGACCATATCAAGGCAGAGGCTAGGTTATCTCCAGCAGGATCTTC										14200
FMS-7T.....										14200
VSF-3T.....										14200
VSF-10T.....										14200
AIK-C	.G.....										14200
MoratenT.....										14200
SchwarzT.....										14200
Edm-Zagreb										14200
RubeovaxT.....										14200
Changchun-47										14200
MeV-IchinoseB95aG.....G.....T.....										14200
	14210	14220	14230	14240	14250	14260	14270	14280	14290	14300	
Edmonston-wt	GTGGAACATAAAATCCAATTATTGTAGACCATTACTCATGCTCTCTGACTTATCTCCGGCGAGGATCGATCAAACAGATAAGATTGAGAGTTGATCCAGGA										14300
FMS-7										14300
VSF-3										14300
VSF-10										14300
AIK-C										14300
Moraten										14300
Schwarz										14300
Edm-Zagreb										14300
Rubeovax										14300
Changchun-47										14300
MeV-IchinoseB95aT.....T.....										14300
	14310	14320	14330	14340	14350	14360	14370	14380	14390	14400	
Edmonston-wt	TTCATTTTCGACGCCCTCGCTGAGGTAAATGTCAGTCAGCCAAAGATCGGCAGCAACAACATCTCAAATATGAGCATCAAGGATTTTCAGACCCCCACACG										14400
FMS-7C.....										14400
VSF-3C.....										14400
VSF-10C.....										14400
AIK-CC.....										14400
MoratenC.....										14400
SchwarzC.....										14400
Edm-ZagrebC.....										14400
RubeovaxC.....										14400
Changchun-47C.....										14400
MeV-IchinoseB95aT.....G.....T.....										14400

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          14410      14420      14430      14440      14450      14460      14470      14480      14490      14500
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt ATGATGTTGCAAAATTGCTCAAAGATATCAACACAAGCAAGCACAATCTTCCCATTTCAGGGGGCAATCTCGCCAATTATGAAATCCATGCTTTCCGCAG 14500
FMS-7        ..... 14500
VSF-3        ..... 14500
VSF-10       ..... 14500
AIK-C        ..... 14500
Moraten      ..... 14500
Schwarz      ..... 14500
Edm-Zagreb   ..... 14500
Rubeovax     ..... 14500
Changchun-47 ..... 14500
MeV-IchinoseB95a ..... T.G. 14500

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          14510      14520      14530      14540      14550      14560      14570      14580      14590      14600
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt AATCGGGTTGAACTCATCTGCTTGCTACAAAGCTGTTGAGATATCAACATTAATTAGGAGATGCCTTGAGCCAGGGGAAGACGGCTTGTCTTGGGTGAG 14600
FMS-7        ..... G. 14600
VSF-3        ..... G. 14600
VSF-10       ..... G. 14600
AIK-C        ..... G. 14600
Moraten      ..... G. 14600
Schwarz      ..... G. 14600
Edm-Zagreb   ..... G. 14600
Rubeovax     ..... G. 14600
Changchun-47 ..... G. 14600
MeV-IchinoseB95a ..... A. 14600

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          14610      14620      14630      14640      14650      14660      14670      14680      14690      14700
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt GGATCGGGTTCATGTTGATCACTTATAAGGAGATACTTAACTAAACAAGTGCTTCTATAATAGTGGGGTTTCCGCCAATTCTAGATCTGGTCAAAGGG 14700
FMS-7        ..... 14700
VSF-3        ..... 14700
VSF-10       ..... 14700
AIK-C        ..... 14700
Moraten      ..... A. 14700
Schwarz      ..... A. 14700
Edm-Zagreb   ..... C. 14700
Rubeovax     ..... 14700
Changchun-47 ..... 14700
MeV-IchinoseB95a ..G. A. 14700

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          14710      14720      14730      14740      14750      14760      14770      14780      14790      14800
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  AATTAGCACCTATCCCTCCGAAGTTGGCCTTGTCGAACACAGAATGGGAGTAGGTAATATTGTCAAAGTGCTCTTTAACGGGAGGCCCGAAGTCACGTG 14800
FMS-7        ..... 14800
VSF-3        ..... 14800
VSF-10       ..... 14800
AIK-C        ..... 14800
Moraten      ..... 14800
Schwarz      ..... 14800
Edm-Zagreb   ..... 14800
Rubeovax     ..... 14800
Changchun-47 ..... 14800
MeV-IchinoseB95a .....G..... 14800

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          14810      14820      14830      14840      14850      14860      14870      14880      14890      14900
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  GGTAGGCAGTGTAGATTGCTTCAATTTTCATAGTTAGTAATATCCCTACCTCTAGTGTGGGGTTTATCCATTCAGATATAGAGACCTTGCCTAACAAAGAT 14900
FMS-7        .....G..... 14900
VSF-3        .....G..... 14900
VSF-10       .....G..... 14900
AIK-C        ..... 14900
Moraten      .....G..... 14900
Schwarz      .....G..... 14900
Edm-Zagreb   ..... 14900
Rubeovax     .....G..... 14900
Changchun-47 ..... 14900
MeV-IchinoseB95a .....A.....C.....A..... 14900

```

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          14910      14920      14930      14940      14950      14960      14970      14980      14990      15000
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Edmonston-wt  ACTATAGAGAAGCTAGAGGAATTGGCAGCCATCTTATCGATGGCTCTGCTCCTGGGCAAAATAGGATCAATACTGGTGATTAAGCTTATGCCTTTTCAGCG 15000
FMS-7        ..... 15000
VSF-3        ..... 15000
VSF-10       ..... 15000
AIK-C        ..... 15000
Moraten      ..... 15000
Schwarz      ..... 15000
Edm-Zagreb   ..... 15000
Rubeovax     ..... 15000
Changchun-47 ..... 15000
MeV-IchinoseB95a .....A.....T..... 15000

```

	15010	15020	15030	15040	15050	15060	15070	15080	15090	15100	
Edmonston-wt	GGGATTTTGTTCAGGGATTATAAGTTATGTAGGGTCTCATTATAGAGAAGTGAACCTTGTATACCCTAGATACAGCAACTTCATATCTACTGAATCTTA										15100
FMS-7										15100
VSF-3										15100
VSF-10										15100
AIK-CT.....										15100
MoratenC.....										15100
SchwarzC.....										15100
Edm-ZagrebC.....										15100
RubeovaxC.....										15100
Changchun-47										15100
MeV-IchinoseB95aC.....C.....G.....										15100

	15110	15120	15130	15140	15150	15160	15170	15180	15190	15200	
Edmonston-wt	TTTGGTTATGACAGATCTCAAGGCTAACCGGCTAATGAATCCTGAAAAGATTAAGCAGCAGATAATTGAATCATCTGTGAGGACTTCACCTGGACTTATA										15200
FMS-7										15200
VSF-3										15200
VSF-10										15200
AIK-C										15200
Moraten										15200
Schwarz										15200
Edm-Zagreb										15200
Rubeovax										15200
Changchun-47										15200
MeV-IchinoseB95a	...A.....A.....C.....C.....										15200

	15210	15220	15230	15240	15250	15260	15270	15280	15290	15300	
Edmonston-wt	GGTCACATCCTATCCATTAAGCAACTAAGCTGCATACAAGCAATTGTGGGAGACGCAGTTAGTAGAGGTGATATCAATCCTACTCTGAAAAAATTACAC										15300
FMS-7										15300
VSF-3										15300
VSF-10										15300
AIK-C										15300
Moraten										15300
Schwarz										15300
Edm-Zagreb										15300
Rubeovax										15300
Changchun-47										15300
MeV-IchinoseB95aG.....C.....T.....										15300

	15310	15320	15330	15340	15350	15360	15370	15380	15390	15400	
Edmonston-wt	CTATAGAGCAGGTGCTGATCAATTGCGGGTTGGCAATTAACGGACCTAAGCTGTGCAAAGAATTGATCCACCATGATGTTGCCTCAGGGCAAGATGGATT										15400
FMS-7										15400
VSF-3										15400
VSF-10										15400
AIK-C										15400
Moraten										15400
Schwarz										15400
Edm-Zagreb										15400
Rubeovax										15400
Changchun-47										15400
MeV-IchinoseB95aG.....A.....A.....										15400

	15410	15420	15430	15440	15450	15460	15470	15480	15490	15500	
Edmonston-wt	GCTTAATTCATACTCATCTCTACAGGGAGTTGGCAAGATTCAAAGACAACCAAAGAAGTCAACAAGGGATGTTCCACGCTTACCCCGTATTGGTAAGT										15500
FMS-7										15500
VSF-3										15500
VSF-10										15500
AIK-CG.....										15500
Moraten										15500
Schwarz										15500
Edm-Zagreb										15500
Rubeovax										15500
Changchun-47										15500
MeV-IchinoseB95aC.....										15500

	15510	15520	15530	15540	15550	15560	15570	15580	15590	15600	
Edmonston-wt	AGCAGGCAACGAGAACTTATATCTAGGATCACCCGCAAATTTGGGGGCACATTCTTCTTTACTCCGGGACAGAAAGTTGATAAATAAGTTTATCCAGA										15600
FMS-7										15600
VSF-3										15600
VSF-10										15600
AIK-C										15600
MoratenC.....A.....										15600
SchwarzC.....A.....										15600
Edm-Zagreb										15600
RubeovaxC.....										15600
Changchun-47										15600
MeV-IchinoseB95a	..T.....G.....T.....T.....T.....T.....CG.....										15600

ANEXO II

Study of the genetic stability of measles virus CAM-70 vaccine strain after serial passages in chicken embryo fibroblasts primary cultures

Maria Beatriz Borges · Elena Caride · Alfredo V. Jabor · José Marcus N. Malachias · Marcos S. Freire · Akira Homma · Ricardo Galler

Received: 10 September 2007 / Accepted: 31 October 2007 / Published online: 27 November 2007
© Springer Science+Business Media, LLC 2007

Abstract To evaluate the genetic stability of the CAM-70 measles vaccine strain we have performed 10 serial passages of the seed lot virus FMS-7 in chicken embryo fibroblasts primary cultures (CEF) under production conditions. The nucleotide sequences of the seed lot virus, the virus from a vaccine vial (third passage) and from the 10th passage were determined and compared with each other and with sequences from other sources. The full genome analysis of the CAM-70 vaccine still considers it as the most divergent among all vaccine strains. The nucleotide sequence analyses of viral genomes from the three CAM-70 passage levels have demonstrated that they are identical. This study shows that the measles CAM-70 vaccine virus is highly adapted to its cultivation conditions and that its genetic stability contributes, in part, to the safety profile of the vaccine.

Keywords Measles virus · Genetic stability · CAM-70 · Vaccine strain · Sequencing · Serial passages

Introduction

Measles virus is an enveloped RNA virus of the genus *Morbillivirus* and *Paramyxoviridae* family. Its genome is single-stranded, non-segmented of negative polarity consisting of 15,894 nucleotides. The 3' end of the genome contains a non-coding region (NCR) of 107 nucleotides called the genomic promoter (GP) which includes the

leader sequence with 52 nucleotides, the gene start (GS) signal for transcription of the N gene and a B'-box motif responsible for the regulation of transcription and viral replication [1]. The genome contains six non-overlapping cistrons (3'-N-P/C/V-M-F-H-L-5') that encode eight polypeptides [2].

Each transcriptional unit is separated by an intergenic region (IR) containing a conserved trinucleotide GAA preceded by U residues and followed by a start signal for the next gene. The exception is between H and L genes where the trinucleotide is GCA. The 5'-end non-coding region of 109 nucleotides is called the antigenomic promoter (AGP) and encompasses the 37 trailer nucleotides, the B'-box and (GN₅)₃ motifs and the gene end signal of the L gene [1, 3, 4]. Between the M and F genes there is an unusually long untranslated region, with ~1,000 nucleotides, which is unique for most morbilliviruses [5] and its high GC content suggests the formation of secondary structures which are thought to be responsible for regulation of translation or localization of mRNAs [6, 7].

Measles virus causes an acute illness of childhood considered one of the most contagious infections of mankind [8]. Despite the availability of a safe and effective vaccine for the last 40 years, outbreaks continue to occur, especially in developing countries. Measles has accounted for more than half a million deaths occurring annually among children [9]. The interruption of virus transmission requires vaccine coverage above 95%, which is not achieved in many regions, particularly in Africa [10, 11]. The prototype Edmonston strain of measles virus isolated by Enders and Peebles in 1954 was used for the development of many currently adopted live-attenuated measles vaccines, such as Schwarz, Moraten, and Edmonston-Zagreb. A Japanese live-attenuated measles vaccine has been produced and used in Brazil since the early 1980s.

M. B. Borges (✉) · E. Caride · A. V. Jabor · J. M. N. Malachias · M. S. Freire · A. Homma · R. Galler
Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil,
4365 – Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21040-360, Brazil
e-mail: borges@bio.fiocruz.br

This vaccine was developed in Japan [12–15] from material collected from the oropharynx of a patient called Tanabe and isolated by Dr. M. Mutai in primary kidney cells of *Cynomolgus* monkeys. After serial passages in monkey kidney cells, human kidney cells, chicken amnion, chicken chorioallantoic membrane, and chicken embryo fibroblasts, the CAM-70 vaccine strain was isolated (Fig. 1). This vaccine is used mostly in Japan and Brazil and has been considered by some authors to be more attenuated than other measles vaccine strains [16], what was compensated by an increase of virus load per dose of vaccine. Nevertheless, routine immunization with this vaccine was an important contribution to hamper virus transmission and reduce indigenous measles circulation in Brazil. The aim of this study was to evaluate the genetic stability of CAM-70 vaccine virus strain after serial passages of the seed lot FMS-7 in primary cultures of chicken embryo fibroblasts (CEF) reproducing production parameters to characterize our product at the molecular level and provide further information on the genetic variation among measles virus vaccine strains.

Materials and methods

Viruses

The master seed virus FMS-7 is kept at -70°C and a vial was provided for this study. The freeze-dried CAM-70 vaccine lot No. 96/SB005Z was supplied in five doses vials. This vaccine was obtained through three passages of the seed lot FMS-7 in chicken embryo fibroblast cultures (CEF) (Fig. 1).

Preparation of CEF cultures and passages of the seed lot virus

Eleven-day-old embryos were removed from specific pathogen free (SPF) eggs and the head and viscera removed and discarded. The remaining tissue was washed with PBS, extruded and treated with trypsin to give a monodisperse cell suspension [17]. Cells were then seeded in roller bottles in 199 Hank's salts medium with fetal bovine serum, as previously described [18]. The seed virus FMS-7 was inoculated following the procedure of Freire and co-workers [18] using an incubation temperature of 30°C . The seed virus was passaged 10 times in CEF and the viruses from the passage levels used in this study were termed VSF-1 to VSF-10. Harvest was performed at 8 days post-infection. Roller bottles containing the infected cultures with stabilizers added were shell-frozen by

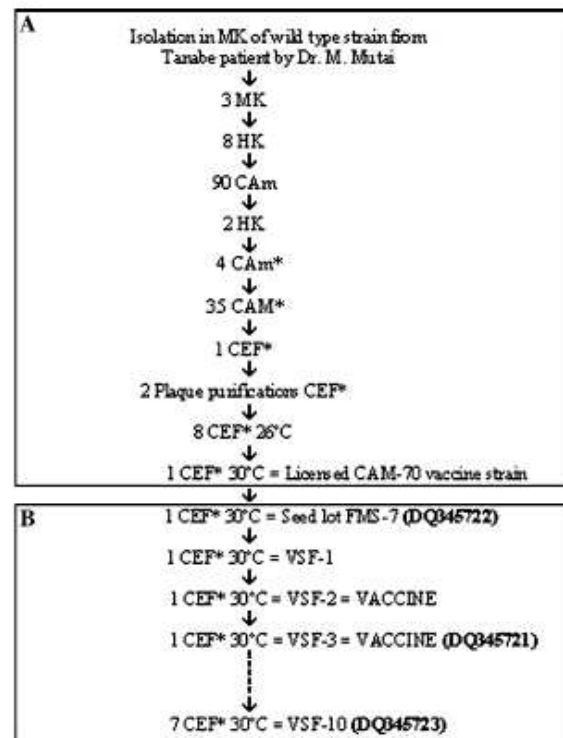


Fig. 1 Passage history of CAM-70 vaccine strain. (a) Vaccine attenuation history (b) passages for Bio-Manguinhos vaccine production and evaluation of genetic stability. Temperature of incubation assumed to be 37°C except when indicated. Numbers refer to the number of passages in each cell type. MK = monkey kidney; HK = human kidney; CA = amniotic membrane of chicken embryos; CAM = chorioallantoic membrane; * = specific pathogen free (SPF); CEF = chicken embryo fibroblasts. Bold characters indicate GenBank Accession Numbers

rotation in ethanol dry ice bath. After thawing, virus suspension was clarified by centrifugation, aliquoted, and frozen at -70°C .

Complementary DNA synthesis, amplification, and nucleotide sequencing

Total RNA was extracted from the virus suspensions with TRIzol[®] LS reagent (Invitrogen) using 20–40 μg of glycogen as a carrier according to manufacturer's protocol. RNA from the seed lot virus was extracted directly from the supplied freeze-dried sample without further propagation in cell culture to avoid potential mutations.

Complementary DNA synthesis (RT) was performed using a ThermoScript[™] RT-PCR kit (Invitrogen) and random hexamers. Amplification was carried out using Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity

(Invitrogen). A total of 16 PCR products were synthesized encompassing nucleotides 1–1040, 951–2240, 1825–2631, 2206–3900, 3558–4274, 3865–4463, 3916–5150, 5022–5866, 5401–7058, 6958–8647, 8552–10050, 9983–11531, 11491–12993, 12465–13466, 12961–14474, and 14451–15877. The primers were designed based on the published measles virus Moraten strain sequence. The PCR products were purified using a QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) and directly sequenced with the BigDye terminator mix version 3.1 (Applied Biosystems) according to manufacturer's recommendations. Electrophoresis of fluorescent products was performed in an ABI PRISM 3100 instrument (Applied Biosystems). Nucleotide sequences were analyzed and a consensus sequence for each virus genome or region was derived from contiguous sequences using SeqMan II software from Lasergene package version 4.05 (DNASTar).

Results and discussion

Measles virus is serologically monotypic and is genetically characterized in eight clades (A–H), divided in 22 recognized genotypes [19]. All measles vaccines, despite their diverse geographic origins or different attenuation procedures, are classified in clade A. The cell types and passage temperatures used for obtaining each vaccine virus varied widely [20]. The nucleotide changes observed among them are probably due to adaptations undergone by the viruses submitted to these various selective pressures [21–24]. Currently, the associations between molecular changes and attenuated phenotype remain unclear [22, 25].

We have investigated the genetic stability of CAM-70 vaccine strain after 10 serial passages in cultured cells using cultivation conditions equal to that of the vaccine

production process. Nucleotide sequencing was performed directly on the amplified cDNA without additional cloning and the sequences were deposited in the GenBank (Table 1). The results obtained for the seed virus FMS-7, for the virus from a vaccine lot (third passage) and passage 10 has revealed identical genomic sequences. Two base heterogeneities found in positions 5180 and 5187 of the genome of FMS-7 were maintained throughout all 10 passages in CEF. These heterogeneities are located in the intergenic space between genes M and F. Intergenic regions contain cis-acting elements that are involved in control of gene expression and genome replication. Parks et al. have investigated the presence of attenuation markers within measles virus cis-acting regulatory elements [22]. The nucleotide heterogeneities found in the CAM-70 genome were not related to the potential attenuation determinants described previously [22]. Nevertheless, changes in the RNA secondary structures may alter virus phenotype [5]. Additionally, Takeda and co-workers, using reverse genetics, have suggested a role for the untranslated region between M and F genes in the control of replication and cytopathogenicity [5]. According to some authors, nucleotide changes are expected to occur in this region and would not exert a significant influence in virulence, since this region can accumulate and tolerate such changes [26, 27]. Even though the CAM-70 measles vaccine attenuation procedure included a plaque purification step, the presence and preservation of heterogeneities could confer virus growth advantages acquired during vaccine manufacturing as already described for yellow fever vaccine [28]. Since, the occurrence of nucleotide heterogeneities in measles virus genomic sequences has never been reported, our discussion is limited by the paucity of data on this matter. Notwithstanding, it is important to emphasize the limitation of genome analysis by direct sequencing which is

Table 1 Nucleotide and amino acid changes among CAM-70 sequences

Position	Gene	Sequence DQ345721 ^a DQ345722 ^b DQ345723 ^c	Sequence AF517559 ^d	Sequence U03649 ^e	Expression
2545	P	TTG	CTG	–	Silent
3041	P	AGA	AAA	–	R → K
7548	H	ATA	–	ACA	I → T
9144	H	A	–	T	Untranslated ^f
9203	H	G	–	A	Untranslated

^a GenBank Accession No. for CAM-70 third passage

^b GenBank Accession No. for CAM-70 seed lot FMS-7

^c GenBank Accession No. for CAM-70 tenth passage

^d GenBank Accession No. for Santos et al. [31]

^e GenBank Accession No. for Rota et al. [21]

^f Untranslated region of the gene

able to detect mutations only when present in concentrations >10–20% [29, 30].

There are three nucleotide differences in the H gene when comparing with the sequence of Rota and co-workers [21], and two nucleotides differences in the P gene when comparing with the sequence of Santos and co-workers [31] (Table 1). In fact, both studies have used a few passages of the CAM-70 virus in Vero cells to obtain the stock used for RNA extraction and cDNA synthesis. Moreover, they have sequenced cloned cDNA fragments rather than RT-PCR products. It was described that propagation in Vero cells altered the plaque and growth phenotypes of measles AIK-C vaccine strain. The AIK-C vaccine is produced in chicken embryo fibroblasts and its passaging in a different cell type, like Vero, may lead to genome changes that reflect adaptations to host cell [24]. Furthermore, RT-PCR products represent the majority of viral genomes and their use for genome sequencing does not reveal minor populations that may arise during cell passage. In infected cells single and multiple variants may arise, but normally most or all of them will be maintained at low frequencies by negative selection. This is especially true for RNA viruses passaged many times in cell culture under defined conditions [32].

The analysis of all coding and non-coding regions of CAM-70 vaccine strain used in this study was conducted by comparing the CAM-70 virus and other vaccine viruses with known genomic sequences. Sequence alignments are presented in Table 2 and the number of nucleotide changes is resumed in Table 3. The genomic sequences of wild type viruses that originated most of the non-Edmonston derived vaccines, as CAM-70, are not available. However, the very high level of relatedness between wild-type viruses from genotype A and vaccine strains [1] lead us to consider, for ease of analysis, the Edmonston wild-type isolate as the progenitor wild-type virus for all vaccine strains. The nucleotide changes observed among the vaccine strains are widespread along the 13 distinct regions in the 15,894 nt-long genome of measles virus (Table 3). There are a total of 71 nucleotide differences in CAM-70 in relation to the Edmonston wild-type. Ten substitutions occurred in the non-coding regions and 61 in the coding regions causing 61 amino acid changes. Based on sequence alignment analysis, our results have demonstrated that the CAM-70 strain is the most divergent while the Edmonston-Zagreb is the most similar with 99.55% and 99.8% of similarity, respectively. Fifteen nucleotide changes occur at the same genome position in all the vaccine strains studied, resulting in 10 amino acid changes. Such changes are not clustered in any specific region, but are rather discretely spread throughout the genome. One coding substitution at position 8906 was

common to all the vaccines except for Edmonston-Zagreb that did not change.

The 3'-leader shows one nucleotide change common to all the vaccines (position 26), another common to all the vaccines except for Edmonston-Zagreb (position 42), and two changes specific to the Edmonston-Zagreb virus (positions 42 and 96). The 5'-terminal region presented one specific change for each of the following viruses: the AIK-C virus (position 15789), the CAM-70 virus (position 15795), and the Edmonston-Zagreb virus (position 15843). According to Liu et al., nucleotide substitutions at position 26 of 3'-leader had a significant effect on viral replication in a mini-genome assay [1]. Based on sequence analysis, Parks et al. suggested that nucleotide substitutions in the 3'-leader sequence could be related with the attenuation of measles virus [21]. No consistent substitution pattern has yet been observed for the 5'-trailer region [1].

The long untranslated region between M and F genes accumulated the highest number of substitutions (4) of all CAM-70 virus non-coding regions. This pattern was also reported by Santak et al. in the analysis of SSPE virus and D6 genotype measles virus [27]. The P gene of CAM-70 virus was the most divergent with 12 exclusive mutations and two mutations shared by all the vaccines.

Previous genetic analyses of coding regions of CAM-70 have considered this vaccine the most divergent member within its clade [21, 31]. Our analysis comparing the full genome of CAM-70 with that of other measles vaccines confirms this observation. This may be a consequence of the high number of passages in the attenuation procedure as well as the cultivation conditions that included, most exclusively, passages in avian cells, except for the few initial passages in mammalian cells. Nevertheless, it also may account for differences between the progenitor wild-type Edmonston and Tanabe viruses.

Previous studies have suggested that measles virus have a mutation rate similar to that of other RNA viruses [33]. Nonetheless, epidemiological surveys have provided evidence that measles virus shows marked genetic stability in the field. Little genomic sequence variation could be observed in isolates from a common chain of transmission as well as in isolates from the same genotype collected at different times [34–36]. The mutation rates estimates would also infer that the various genotypes presently found circulating in the world reflect long-standing variation of measles virus. This study demonstrates that the measles CAM-70 vaccine virus is highly adapted to its cultivation conditions and stable from the genetic point of view. This genetic stability may account, at least in part, for the safety profile of the vaccine manufactured with the measles CAM-70 virus.

Table 2 Comparison of the full genomic sequences of the measles Edmonston wild-type virus and measles vaccine strains

Nt pos	AA pos	Ed wt	CAM	AIK	Mor	Sch	EZ	Rub	C47	AA
26	–	A	T	T	T	T	T	T	T	–
42	–	A	C	C	C	C	T	C	C	–
96	–	G	•	•	•	•	A	•	•	–
275	N56	C	•	•	G	G	•	•	•	V
280	N58	T	C	•	•	•	•	•	•	L → S
449	N114	T	A	•	•	•	•	•	•	L
492	N129	C	•	A	•	•	•	•	•	Q → K
548	N147	C	•	•	•	•	•	•	T	F
550	N148	A	•	•	G	G	•	•	•	E → G
623	N172	C	•	•	•	•	T	•	•	A
722	N205	A	•	•	•	•	•	G	•	V
903	N266	T	C	•	•	•	•	•	•	L
998	N297	G	A	•	•	•	•	•	•	E
1214	N369	A	G	•	•	•	•	•	•	V
1408	N434	G	C	•	•	•	•	•	•	G → A
1528	N474	A	•	•	•	•	•	•	C	D → A
1542	N479	T	•	•	A	A	•	A	•	S → T
1702	–	A	G	•	G	G	•	G	•	–
1724	–	C	•	•	A	A	•	•	•	–
1806	–	G	A	•	A	A	•	A	•	–
1866	P20	G	A	•	•	•	•	•	•	K
2046	P80	C	T	T	T	T	T	T	T	G
2098	P98	A	G	•	•	•	•	•	•	G → R
2101	P99	A	G	•	•	•	•	•	•	D → N
2134	P110	T	•	•	•	•	•	•	C	Y → H
2135	P110	A	G	•	•	•	•	•	•	Y → C
2139	P111	T	•	•	C	C	•	C	•	Y
2167	P121	A	G	•	•	•	•	•	•	K → E
2194	P130	A	G	•	•	•	•	•	•	M → V
2219	P138	A	G	•	•	•	•	•	•	D → G
2222	P139	G	•	•	•	•	•	•	A	S → N
2229	P141	C	•	A	•	•	•	•	•	L
2299	P165	A	G	•	•	•	•	•	•	I → V
2451	P215	C	•	•	•	•	T	•	•	P
2480	P225	A	G	G	G	G	G	G	G	E → G
2603	P266	G	C	•	•	•	•	•	•	G → A
2630	P275	G	•	A	•	•	•	•	•	C → Y
2659	P285	T	C	•	•	•	•	•	•	W → R
2709	P301	A	G	•	•	•	•	•	•	E
2710	P302	G	•	•	•	•	•	•	A	E → K
3061	P419	C	A	•	•	•	•	•	•	L → I
3122	P439	T	•	C	•	•	•	•	•	L → P
1866	C13	G	A	•	•	•	•	•	•	R → K
2046	C73	C	T	T	T	T	T	T	T	A → V
2098	C90	A	G	•	•	•	•	•	•	Q
2101	C91	A	G	•	•	•	•	•	•	E
2134	C102	T	•	•	•	•	•	•	C	V
2135	C103	A	G	•	•	•	•	•	•	I → V

Table 2 continued

Nt pos	AA pos	Ed wt	CAM	AIK	Mor	Sch	EZ	Rub	C47	AA
2139	C104	T	•	•	C	C	•	C	•	M → T
2167	C113	A	G	•	•	•	•	•	•	L
2194	C122	A	G	•	•	•	•	•	•	S
2219	C131	A	G	•	•	•	•	•	•	I → V
2222	C132	G	•	•	•	•	•	•	A	A → T
2229	C134	C	•	A	•	•	•	•	•	S → Y
2299	C157	A	G	•	•	•	•	•	•	L
1866	V20	G	A	•	•	•	•	•	•	K
2046	V80	C	T	T	T	T	T	T	T	G
2098	V98	A	G	•	•	•	•	•	•	R → G
2101	V99	A	G	•	•	•	•	•	•	N → D
2134	V110	T	•	•	•	•	•	•	C	Y → H
2135	V110	A	G	•	•	•	•	•	•	Y → C
2139	V111	T	•	•	C	C	•	C	•	Y
2167	V121	A	G	•	•	•	•	•	•	K → E
2194	V130	A	G	•	•	•	•	•	•	M → V
2219	V138	A	G	•	•	•	•	•	•	D → G
2222	V139	G	•	•	•	•	•	•	A	S → N
2229	V141	C	•	A	•	•	•	•	•	L
2299	V165	A	G	•	•	•	•	•	•	I → V
2451	V215	C	•	•	•	•	T	•	•	P
2480	V225	A	G	G	G	G	G	G	G	E → G
2603	V266	G	C	•	•	•	•	•	•	R → S
2629	V275	G	•	A	•	•	•	•	•	V
2659	V285	T	C	•	•	•	•	•	•	V → A
3431	–	T	•	•	G	G	•	•	•	–
3448	M4	T	•	•	C	C	•	C	•	I → T
3487	M17	C	•	•	•	•	T	•	•	S → L
3506	M23	C	•	G	•	•	•	•	•	P
3598	M54	T	•	C	•	•	•	•	•	F → S
3619	M61	G	A	A	A	A	A	A	A	D → G
3627	M64	C	T	•	T	T	•	T	•	P → S
3661	M75	C	•	•	T	T	•	•	•	S → F
3702	M89	G	A	A	A	A	A	A	A	E → K
3868	M144	T	•	•	•	•	•	•	C	V → A
3889	M151	C	•	•	•	•	•	•	A	T → N
3968	M177	G	A	•	•	•	•	•	•	M → I
4013	M192	G	•	•	•	•	•	•	A	V
4111	M225	G	T	•	•	•	•	•	•	R → M
4118	M227	G	T	•	•	•	•	•	•	K → N
4292	M285	G	A	•	•	•	A	•	•	I → M
4515	–	G	•	•	•	•	•	•	A	–
4536	–	G	•	T	•	•	•	•	•	–
4574	–	G	•	A	•	•	•	•	•	–
4608	–	T	•	•	•	•	•	C	C	–
4611	–	C	•	T	•	•	T	•	•	–
4742	–	T	•	•	•	•	•	•	C	–
4763	–	T	•	•	•	•	•	•	C	–

Table 2 continued

Nt pos	AA pos	Ed wt	CAM	AIK	Mor	Sch	EZ	Rub	C47	AA
4925	–	G	•	•	•	•	•	•	T	–
4978	–	T	C	C	C	C	C	C	C	–
5030	–	C	•	T	•	•	•	•	•	–
5180*	–	T	T/c	•	•	•	•	•	•	–
5187*	–	T	T/c	•	•	•	•	•	•	–
5308	–	T	•	•	•	•	•	C	•	–
5348	–	T	•	•	•	•	C	•	•	–
5349	–	T	C	C	C	C	C	C	C	–
5402	–	C	T	•	•	•	•	•	•	–
5427	–	T	C	•	•	•	•	•	•	–
5514	F19	G	A	A	A	A	A	A	A	Q
5613	F52	A	C	•	•	•	•	•	•	Q → H
5776	F107	A	G	•	•	•	•	•	•	S → G
5944	F163	G	•	•	A	A	•	•	•	A → T
5950	F165	A	G	•	•	•	•	•	•	R → G
5956	F167	G	•	•	•	•	•	•	T	A → S
6102	F215	A	G	•	•	•	•	•	•	S
6117	F220	C	•	•	T	T	•	T	•	S
6244	F263	A	•	•	G	G	•	G	•	R → G
6475	F340	G	•	•	•	•	•	•	A	G → R
6542	F362	C	T	A	A	A	•	A	•	S → Y → F
6649	F398	T	C	•	•	•	•	•	•	Y → H
6707	F417	C	A	•	•	•	•	•	•	A → D
6712	F419	C	•	A	•	•	•	•	•	H → N
6743	F429	C	•	•	•	•	•	T	•	T → I
6774	F439	C	•	•	•	•	T	•	•	D
6815	F453	C	•	T	•	•	•	•	•	S → L
6937	F494	A	•	T	•	•	•	•	•	S → C
7143	–	C	G	•	•	•	•	•	•	–
7243	–	T	•	•	C	C	•	•	•	–
7407	H46	C	T	T	T	T	T	T	T	S → F
7544	H92	C	•	•	•	•	•	•	T	L
7548	H93	C	T	•	•	•	•	•	•	T → I
7621	H117	C	•	•	A	A	•	•	•	F → L
7669	H133	C	•	•	•	•	•	•	A	F → L
7740	H157	T	C	•	•	•	•	•	•	V → A
7794	H175	G	A	•	•	•	•	•	•	R → K
7901	H211	A	G	G	G	G	G	G	G	S → G
8109	H280	T	•	•	•	•	C	•	•	V → A
8174	H302	G	•	C	•	•	•	•	•	G → R
8282	H338	C	T	A	•	•	•	•	•	P → T → S
8634	H455	C	A	•	•	•	•	•	•	T → N
8641	H457	G	•	A	•	•	•	•	•	P
8707	H479	T	C	•	•	•	•	•	•	S
8711	H481	A	T	T	T	T	T	T	T	Y → N
8721	H484	C	•	A	•	•	A	•	A	T → N
8784	H505	A	G	•	•	•	•	•	•	D → G
8906	H546	G	A	A	A	A	•	A	A	S → G

Table 2 continued

Nt pos	AA pos	Ed wt	CAM	AIK	Mor	Sch	EZ	Rub	C47	AA
8918	H550	T	•	•	•	•	•	•	G	S → A
9045	H592	G	A	•	•	•	•	•	•	G → E
9078	H603	G	A	•	•	•	•	•	•	G → E
9139	–	C	•	T	•	•	•	•	•	–
9144	–	A	•	T	•	•	T	•	T	–
9846	L204	A	G	•	•	•	•	•	•	I → V
9874	L213	G	A	•	•	•	•	•	•	S → N
9936	L234	A	G	•	•	•	•	•	•	I → N
10225	L330	T	•	•	C	C	•	•	•	I → T
10555	L440	A	•	•	•	•	G	•	•	K → R
10771	L512	T	•	•	•	•	•	•	C	V → A
11306	L690	A	•	•	•	•	•	•	C	S
11401	L722	A	C	•	•	•	•	•	•	Y → S
11999	L922	A	•	•	•	•	G	•	•	T
12308	L1025	T	•	•	•	•	•	•	C	S
12486	L1084	C	T	•	T	T	•	T	•	L
12505	L1090	G	A	•	•	•	•	•	•	R → K
12506	L1090	G	A	•	•	•	•	•	•	R → K
12521	L1095	C	•	•	•	•	•	•	A	T
12600	L1123	A	•	•	•	•	•	C	•	R
13247	L1338	T	C	•	•	•	•	•	•	L
13458	L1408	G	•	A	•	•	A	•	A	T → A
14066	L1611	C	T	•	•	•	•	•	•	H
14103	L1623	A	•	G	•	•	•	•	•	T → A
14179	L1648	G	T	•	T	T	•	T	•	M → R
<i>14383</i>	<i>L1717</i>	<i>A</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>C</i>	<i>D → A</i>
<i>14579</i>	<i>L1782</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>E</i>
14612	L1792	T	•	•	•	•	C	•	•	S
14630	L1798	G	•	•	A	A	•	•	•	K
14892	L1886	A	G	•	G	G	•	G	•	D → N
15038	L1934	T	•	•	•	•	C	•	•	S
15039	L1935	C	•	T	•	•	•	•	•	H → Y
15086	L1950	A	•	•	C	C	•	C	•	I
15454	L2073	A	•	G	•	•	•	•	•	Q → R
15542	L2102	T	•	•	C	C	•	C	•	F
15574	L2113	G	•	•	A	A	•	•	•	R → K
15704	L2156	T	•	•	•	•	•	•	C	R
15789	–	G	•	A	•	•	•	•	•	–
15795	–	C	T	•	•	•	•	•	•	–
15843	–	T	•	•	•	•	G	•	•	–

Vaccine strains are identified as follows, with their respective GenBank Accession Numbers: Ed wt = Edmonston wild-type (AF266288); CAM = CAM-70: (DQ345721); Sch = Schwarz (AF266291), and Moraten strains (AF266287) share identical genomic sequences; AIK = AIK-C (AF266286); EZ = Edmonston-Zagreb (AY486084); Rub = Rubeovax (AF266289); C47 = Changchun-47 (AF128250). Abbreviations: Nt pos = nucleotide positions; AA pos = amino acid positions; AA = amino acids presented as one-letter symbol. Rows in italics represent nucleotide changes common to all the vaccines. Bold characters represent nucleotide changes exclusive for CAM-70 vaccine. * Nucleotide heterogeneities for CAM-70 strain; nucleotides in capital letters represent the majority of the population

Table 3 Comparison of measles vaccine strains in terms of nucleotide and amino acid substitutions in relation to the Edmonston wild-type virus

Regions ^a	Vaccine strains ^b						
	CAM	Sch	AIK	EZ	Rub	C47	VAC
3'-leader	2	2	2	3	2	2	2
N	6/2	3/2	1/1	1/0	2/1	2/1	0/0
<N-P>	2	3	0	0	2	0	0
P/V/C	14/25	3/4	5/6	3/3	3/4	5/9	2/3
<P-M>	0	1	0	0	0	0	0
M	7/7	5/5	4/3	4/4	4/4	5/4	2/2
<M-F>	4	2	6	4	4	7	2
F	8/6	5/3	5/4	2/0	5/3	3/2	2/1
<F-H>	1	1	0	0	0	0	1
H	13/12	5/5	8/7	5/5	4/4	8/7	4/4
<H-L>	0	0	2	1	0	1	0
L	13/8	10/5	6/5	7/3	8/3	8/3	2/1
5'-terminal	1	0	1	1	0	0	0
Total*	71/60	40/24	40/26	31/15	35/19	41/26	15/10
Similarity (%)	99.55%	99.75%	99.75%	99.8%	99.78%	99.74%	–

^a Regions of the genome are identified in order including the intergenic spaces

^b Vaccine strains are identified as follows, with their respective GenBank Accession Numbers: CAM = CAM-70: DQ345721; Sch = Schwarz (AF266291), and Moraten strains (AF266287) share identical genomic sequences; AIK = AIK-C: AF266286; EZ = Edmonston-Zagreb: AY486084; Rub = Rubeovax: AF266289; C47 = Changchun-47: AF128250; VAC = changes common to all vaccines; *Values are presented as the number of nucleotide substitutions followed by the number of amino acid changes in each genomic region

References

- X. Liu, B. Bankamp, W. Xu, W.J. Bellini, P.A. Rota, *Virus Res.* **122**, 78–84 (2006)
- D.E. Griffin, in *Fields Virology*, 4th edn., ed. by D.M. Knipe, P.M. Howley (Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001), pp. 1267–1312
- J.C. Crowley, P.C. Dowling, J. Menonna, J.I. Silverman, D. Schuback, S.D. Cook, B.M. Blumberg, *Virology* **164**, 498–506 (1988)
- M.S. Sidhu, J. Chan, K. Kaelin, P. Spielhofer, F. Radecke, H. Schneider, M. Masurekar, P.C. Dowling, M.A. Billeter, S.A. Udem, *Virology* **208**, 800–807 (1995)
- M. Takeda, S. Ohno, F. Seki, Y. Nakatsu, M. Tahara, Y. Yanagi, *J. Virol.* **79**(22), 14346–14354 (2005)
- H. Liermann, T.C. Harder, M. Löchelt, V. von Messling, W. Baumgärtner, V. Moennig, L. Haas, *Virus Genes* **17**, 259–270 (1998)
- T.C. Wong, G. Wipf, A. Hirano, *Virology* **157**, 497–508 (1987)
- B. Gellin, S. Katz, *J. Infect. Dis.* **170**, 1–2 (1994)
- S.L. Katz, *J. Infect. Dis.* **192**, 1679–1680 (2005)
- P.T. Cutts, A.-M. Henao-Restrepo, J.M. Olivé, *Vaccine* **17**, 47–52 (1999)
- M.N. Mulders, A.T. Truong, C.P. Muller, *Vaccine* **19**, 2245–2249 (2001)
- S. Ueda, M. Takahashi, Y. Minekawa, T. Ogino, N. Suzuki, K. Yamanishi, *Biken J.* **13**, 111–116 (1970)
- K. Takaku, T. Sasada, T. Konobe, K. Onishi, S. Ueda, *Biken J.* **13**, 163–168 (1970)
- S. Ueda, M. Takahashi, T. Kurimura, T. Ogino, N. Suzuki, *Biken J.* **13**, 169–174 (1970)
- Y. Okuno, S. Ueda, T. Kurimura, N. Suzuki, K. Yamanishi, *Biken J.* **14**, 253–258 (1971)
- S. Berry, H. Hernandez, R. Kanashiro, M. Campos, V. Azabache, G. Gomez, M. Gutierrez, B. Weirs, C. De Quadros, N. Halsey, *Pediatr. Infect. Dis. J.* **11**, 822–827 (1992)
- H. Rubin, in *Tissue Culture Methods and Applications*, ed. by P.F. Kruse, M.K. Patterson (Academic Press, New York, 1973), pp. 119–123
- M.S. Freire, G.F. Mann, R.S. Marchevsky, A.M. Yamamura, L.F. Almeida, A.V. Jabor, J.M. Malachias, E.S. Coutinho, R. Galler, *Vaccine* **23**, 2501–2512 (2005)
- World Health Organization Update of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses: new genotypes and reference strains, *Wkly Epidemiol Rec* **78**, 229–232 (2003)
- P.M. Strebel, M.J. Papania, N.A. Halsey, in *Vaccines*, 4th edn., Chap. 19, ed. by S.A. Plotkin, W.A. Orenstein (WB Saunders Company, Philadelphia, 2003)
- J.S. Rota, Z.D. Wang, P.A. Rota, W.J. Bellini, *Virus Res.* **31**, 317–330 (1994)
- C.L. Parks, R.A. Lerch, P. Walpita, H.P. Wang, M.S. Sidhu, S.A. Udem, *J. Virol.* **75**, 921–933 (2001)
- D.W. Koumou, T.F. Wild, *J. Virol.* **76**, 1505–1509 (2002)
- H. Uejima, T. Nakayama, K. Komase, *Vaccine* **24**(7), 931–936 (2006)
- B. Bankamp, J. Wilson, W.J. Bellini, P.A. Rota, *Virology* **336**, 120–129 (2005)
- A. Heider, S. Santibanez, A. Tischer, E. Gerike, N. Tikhonova, G. Ignatyev, M. Mrazova, G. Enders, E. Schreiber, *Arch. Virol.* **142**, 2521–2528 (1997)
- M. Santak, M. Baricevic, R. Mazuran, D. Forcic, *Infect. Genet. Evol.* **7**(5), 645–650 (2007)
- K.V. Pugachev, S.W. Ocran, F. Guinakhoo, D. Furby, T.P. Monath, *Vaccine* **20**(7–8), 996–999 (2002)
- R. Galler, K.V. Pugachev, C.L. Santos, S.W. Ocran, A.V. Jabor, S.G. Rodrigues, R.S. Marchevsky, M.S. Freire, L.F. Almeida,

- A.C. Cruz, A.M. Yamamura, I.M. Rocco, E.S. da Rosa, L.T. Souza, P.F. Vasconcelos, F. Guirakhoo, T.P. Monath, *Virology* **290**(2), 309–319 (2001)
30. K.V. Pugachev, F. Guirakhoo, S.W. Ocran, F. Mitchell, M. Parsons, C. Penal, S. Girakhoo, S.O. Pougatcheva, J. Arroyo, D.W. Trent, T.P. Monath, *J. Virol.* **78**(2), 1032–1038 (2004)
31. P.R. Santos, M.L.B. Azevedo, M.B.J. Borges, M.S. Freire, J.P. Nascimento, M.T.B. Moraes, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **36**, 1475–1484 (2003)
32. E. Domingo, J.J. Holland, in *The Evolutionary Biology of Viruses*, ed. by S.S. Morse (Raven Press Ltd. New York, 1994), pp. 161–184
33. S.J. Schrag, P.A. Rota, W.J. Bellini, *J. Virol.* **73**(1), 51–54 (1999)
34. J.S. Rota, J.L. Heath, P.A. Rota, G.E. King, M.L. Celma, J. Carabaña, R. Fernandez-Muñoz, D. Brown, L. Jin, W.J. Bellini, *J. Infect. Dis.* **173**(1), 32–37 (1996)
35. M.I. Oliveira, P.A. Rota, S.P. Curti, C.A. Figueiredo, A.M. Afonso, M. Theobaldo, L.T. Souza, S.L. Liffick, W.J. Bellini, J.C. Moraes, K.E. Stevien, E.L. Durigon, *Emerg. Infect. Dis.* **8**(8), 808–813 (2002)
36. B.K. Rima, J.A. Earle, K. Bacsko, V. ter Meulen, U.G. Liebert, C. Carstens, J. Carabaña, M. Caballero, M.L. Celma, R. Fernandez-Muñoz, *J. Gen. Virol.* **78**, 97–106 (1997)

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)