

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE POLIOVÍRUS DERIVADO DA  
VACINA ISOLADOS A PARTIR DE AMOSTRAS AMBIENTAIS

CATIA REGINA VALÉRIO GREGIO

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

Orientador: Dr. Edson Elias da Silva

Rio de Janeiro

2006

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Caracterização genômica de poliovírus derivado da vacina isolados a partir de amostras ambientais

Catia Regina Valério Gregio

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

Aprovado:

\_\_\_\_\_ (Doutor em Ciências)

Dra. Luz Alba Maria Garcete Fonells Arentz

\_\_\_\_\_ (Doutor em Ciências)

Dr. Edson Elias da Silva

\_\_\_\_\_ (Doutor em Ciências)

Dr. Victor Augusto Marins

Orientador: Dr. Edson Elias da Silva

Rio de Janeiro

2006

## FICHA CATALOGRÁFICA

Gregio, Catia Regina Valério

Caracterização de poliovírus derivado da vacina isolados a partir de amostras ambientais/ Catia Regina Valério Gregio. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2006.

xxiii, 118 p., il., tab.

Tese em Vigilância Sanitária, Programa de Pós - graduação em Vigilância Sanitária /INCQS, 2006. Orientador: Edson Elias da Silva.  
1. Vacina Sabin. 2. Poliovírus. 3. Mutações. 4. Recombinação. 5. RT-PCR. 6. Seqüenciamento nucleotídico. 7. Meio Ambiente. 8. Vigilância em Saúde. I. Título.

Genomic characterization of vaccine-derived poliovirus from the environment

*Dedico este trabalho a Jesus Cristo, meu Senhor, aos meus amados pais, Luiz Carlos Grégio e Benedita Valério Grégio, ao meu irmão, Luiz Alberto e ao meu noivo William, por todo o incentivo, dedicação, carinho e amor.*

*“Como suspira a corça suspira pelas correntes das águas,  
assim, por ti, ó Deus, suspira a minha alma, pois outro bem  
não possuo, senão a ti somente.”*

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Edson Elias da Silva, chefe do Laboratório de Enterovírus, pela orientação, amizade, carinho e apoio para que este trabalho fosse realizado.

À “co-orientadora” de todos nós e amiga querida, Eliane Veiga da Costa, pelo apoio em todos os momentos da realização e elaboração deste trabalho, e, principalmente, por ter me ensinado a “Terapia do Abraço”.

À Coordenação do Curso de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS, Dra. Maria Helena e aos secretários Pedro e Gisele.

À FAPERJ pelo financiamento e suporte deste trabalho.

À Dra. Elayse Maria Hachich/CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo), pelo envio das amostras utilizadas no trabalho.

Ao querido amigo, Dr. Cláudio de Moraes Andrade, que sempre me apoiou e acreditou em mim, e me apresentou à família Enterovírus. Obrigada mestre por ter me arrancado do meio dos fungos!

Aos amigos de jornada Dr. Joeler, Dra. Leda Maria e Dra. Neide pelo carinho, força e incentivo, e companhia adorável durante todo o curso. O INCQS teve a melhor safra de doutores este ano. Meu eterno obrigado e minhas congratulações.

Aos meus amigos do Laboratório de Enterovírus, Juliana “Juju” (você é a pessoa mais paciente, prestativa e inteligente que eu já conheci! Você é um doce!), Rafaela “Garrafinha” (meus dias sempre foram adoçados pela sua presença e alegria contagiante, jamais encontrarei alguém com tanta garra para encarar a vida), Gina “Jay” (você não existe! Onde foi que Deus escondeu as tuas asas? Eu achava que lugar de anjo era no céu. Ainda bem que eu estava enganada), Renatinha “Rê” (como pode alguém tão pequeno ser tão tremendamente grande em afeto, carinho e gentileza? Deus usa pacotes pequenos para embrulhar o que Ele faz de melhor!) Aline “Xuru” (Amiga, talvez você não saiba, mas a sua presença, nos momentos mais difíceis, me fez lembrar que Ele tem todo o poder, obrigada!), Aline II (que privilégio tenho de ter a melhor *backing vocal* de todo o mundo. Se o Brasil não está lindo, a minha vida está! Amiga, você é uma deusa!), Rosane “Caraca” e Joseane “Josy” (com a primeira aprendi o que significa fidelidade, com a segunda, o que é perseverar. Com ambas, aprendi o que é vitória), Ana Carolina “Carol” (pela amizade e apoio em todo tempo), Dolcy (o nome já diz tudo! Mais um docinho para alegrar a minha vida), Michelle “Peixinho” (menina, você é linda e eu acredito muito no seu sucesso. Sempre nas minhas orações (“até que você creia!”), Érika (nada era tão gratificante do que ver você implicando com o Fernando e o Silas), Fernando

“Fê” (você tem um jeito todo único de demonstrar carinho. Sua ajuda, amigo, valeu mais que dez mil abraços!), Silas “Sisi” (aonde é que eu vou encontrar alguém como você! Você é absurdamente incrível! Tinha que ser seropedicense!), Fernanda “Fê”, Alex e Júnior (que bom poder terminar mais esta etapa da vida, tendo o enorme prazer de conhecer vocês), Bianca e Renatinha Campos (vocês foram as primeiras a me ajudar!), Luciana e Michele (por Clara e Sofia) e, Márcia, Raquel, Júlia, Carina, Paula, Juliana, Gustavo e Lenise por terem tornado o meu dia sempre radiante. *Não chamarei mais amigos, mais irmãos!* Sem saudades, pois não existe mais lugar para outro sentimento que não o amor que possuo por vocês.

Ao amigo Marius Belluci. “Bello” serei sempre grata a você. Obrigada por ter me hospedado em sua casa, por me carregar de um lado para o outro, pela ajuda eterna com as disciplinas (Faculdade, Mestrado e Doutorado), pelo seu perfeito inglês, por me ensinar que chorar não muda a data das provas (que pena!), por ter me proporcionado novos amigos (Cíntia, Cristina, Otávio, Bárbara, Luciana e Natália) e pela Milla. Acima de tudo, obrigada pelo ombro amigo que me acompanha há 15 anos. Eu tenho vários amigos, todos por demais queridos, mais você sempre será *hors-concours*.

Aos amigos da Catedral da Igreja Assembléia de Deus em Campo Lindo, ao meu Pastor Rinaldo S. Dias, meus coordenadores Roberto e Sueli e toda a juventude da qual farei sempre parte. Orar definitivamente é invadir o impossível e para os adoradores, todo dia é tempo de colheita.

Aos amigos da Igreja Evangélica Ministério Sal da Terra e Luz do Mundo, ao meu amigo e pastor Celso, meus amigos de toda uma vida, meus intercessores de todas as horas e meus irmãos para a vida eterna.

Ao meu Senhor Deus, ao meu eterno Salvador Jesus Cristo e ao meu gracioso Consolador Espírito Santo. Se não fosse por Ti meu Senhor, que estive ao meu lado, este trabalho não teria se tornado realidade em minha vida. *Que darei eu a Ti Senhor por todos os benefícios que me tem feito?* Nada tenho que Tu já não possuas, por isso decidi me entregar a Ti e Te adorar nesta vida e depois da morte, através da ressurreição por Cristo, meu amado Jesus, pela eternidade. Minha vida Te pertence e o meu amor é Teu. Eu te amo meu Rei!

Aos meus pais Luiz Carlos e Benedita. O amor de vocês é a razão da minha vida e o amor que sinto por vocês é o motivo de tudo que faço. Vocês são o meu maior tesouro. Nada que possuo tem maior valor. Muito obrigada pai. Muito obrigada mãe. Deus, definitivamente, se superou quando moldou vocês. Eu não merecia tanto. O amor de vocês me constringe, pela força e dimensão que possuí. Completamente e sempre enamorada por vocês.

Ao meu irmão Luiz Alberto, meu Nem, meu companheiro. Amo muito você caçula. Você será sempre o meu brinquedo favorito. Você é a alegria que enche o meu mundo. Vou amar você garotinho por toda a vida.

Ao meu amor, William. Muito obrigada querido por ter compreendido a necessidade da ausência, pelas muitas caronas e pelo apoio de todas as horas. Vidinha, você é a melhor surpresa que o meu coração já teve! Ele ficou tão alegre, que agora só bate quando escuta a tua voz. Para a felicidade completa dele, decidi viver com você para sempre. Eu te amo muito meu menino! Na data da defesa, meu marido lindo!

A todos os familiares e amigos (Edinaldo, Dinália e Ivonete) que acompanharam bem de perto todo o meu percurso até aqui.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Enterovírus do Departamento de Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, sob a orientação do Dr. Elias da Silva e apoio financeiro da FAPERJ.

## RESUMO

Cinco cepas P1/Sabin, 20 cepas P2/Sabin e 2 cepas P3/Sabin isolados a partir de amostras do meio ambiente no Brasil foram analisadas. Neste estudo todos os isolados foram caracterizadas pelo seqüenciamento parcial da região 5' não codificante (NCR) e pelo seqüenciamento completo do gene da proteína VP1, com o objetivo de demonstrar mutações, as quais são importantes para a reversão à neurovirulência. O seqüenciamento parcial da região 5'NCR revelou que todos os poliovírus isolados do sorotipo 1 apresentaram populações de revertentes G480→A e os 2 isolados do sorotipo 3 apresentaram a reversão U472→C. Nenhum isolado do sorotipo 2 apresentou mutação A481→G. O completo seqüenciamento da região de VP1 demonstrou que nenhum isolado P1/Sabin apresentou substituição nucleotídica, as 2 cepas P3/Sabin apresentaram VP1-6 (Thr→Iso) e 16 cepas P2/Sabin apresentaram VP1-109 (Lys→Arg). O isolado P2/26183 também apresentou mutações VP1-103 (Ser→Lys) e VP1-116 (Val→Gly), enquanto P2/26184 apresentou VP1-155 (Cys→Tyr). As regiões 2C e 3D do genoma foram investigadas pelo uso de primers que hibridizam nestas áreas com o objetivo de verificar a presença de recombinação. Nenhuma cepa envolvida no estudo foi identificada como recombinante. Nenhum poliovírus derivado da vacina foi detectado.

## **ABSTRACT**

Five strains of P1/Sabin, 20 strains of P2/Sabin and 2 strains of P3/Sabin isolated from environmental samples in Brazil were analyzed. In this study all isolates were characterized by partial genomic sequencing of the 5' noncoding region (NCR) and the complete VP1 protein gene VP1, with the objective of finding mutations, which are important for neurovirulence reversion. Partial sequencing of 5'NCR revealed that all type 1 poliovirus isolates had the G→A substitution at the nt 480 and the 2 type 3 poliovirus isolates had the U→C substitution at the nt 472. None type 2 isolate had A→G substitution 481. The complete sequencing of the VP1 region showed that none P1/Sabin strain had nucleotide substitution, the 2 P3/Sabin strain had VP1-6 (Thr→Iso) and 16 P2/Sabin strain had VP1-109 (Lys→Arg). The isolate P2/26183 also presented mutations VP1-103 (Ser→Lys) and VP1-116 (Val→Gly), while P2/26184 showed VP1-155 (Cys→Tyr). The 2C and 3D regions of the viral genome were investigated by the use of primers that hybridize in these areas with the objective to verify the presence of recombination. None of the strain involved in this study was identified as recombinant. None vaccine derived poliovirus was detected.

## LISTA SIGLAS

3'NCR -	3' Noncoding Region
3Dpol -	Região do genoma viral codificando a RNA polimerase
5'NCR -	5' Noncoding Region
A -	Adenina
Aa -	Aminoácido
AFP -	Accute Flaccid Paralysis
AGMK -	African Green Monkey Kidney cells
Ala -	Alanina
Asn -	Asparagina
Asp -	Ácido Aspártico
Bp -	Base pair
C -	Citosina
CA -	Coxsackievírus A
CB -	Coxsackievírus B
CDC -	Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA
cDNA -	Ácido desoxirribonucléico complementar
CETESB -	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CIVD -	Commom Variable Immunodeficiency Syndrome
CODESP -	Companhia de Docas do Estado de São Paulo
CPE -	Cytophatic Effect
cVDPV -	Vaccine-Derived Poliovirus circulated
Da -	Dalton
dATP -	Deoxiadenosina trifosfato
dCTP -	Deoxicitosina trifosfato
ddNTP's -	Dideoxynucleotídeos trifosfato
dGTP -	Deoxiguanosina trifosfato
DICT 50 -	Dose infectante para 50% das culturas de células
DNA -	Ácido desoxirribonucléico
dNTP's -	Deoxynucleotídeos trifosfato
dTTP -	Deoxitimidina trifosfato
ECHO -	Enteric Cytopathogenic Human Orphan
ECP -	Efeito citopático

## LISTA SIGLAS

EDTA -	Ácido Etileno-Diamino-Tetracético
Elisa -	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EV -	Enterovírus
Gln -	Glutamina
Glu -	Ácido Glutâmico
Gly -	Glicina
HCl -	Ácido Clorídrico
Hep2 -	Célula de carcinoma epidermóide de laringe humana
HEV -	Enterovírus Humano
His -	Histidina
ICTVdb -	International Committee on Taxonomy of Viruses data Basis
Ile -	Isoleucina
IPV -	Inactivated Poliovirus Vaccine
IRES -	Internal Ribosome Entry Site
ITD -	Intratypic Differentiation
iVDPV -	Vaccine-Derived Poliovirus Associated with Immunodeficiency
Kb -	Kilo-bases
Kd -	Kilo-daltons
L20B -	Mouse cell line expressing the gene for the human cellular receptor for poliovirus
Leu -	Leucina
Lyz -	Lisina
MAPREC -	Mutant Analysis by Polymerase chain reaction and Enzyme Cleavage
MEM -	Minimal Essential Medium - Meio Mínimo Essencial
Met -	Metionina
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MNVT -	Monkey Neurovirulence Test
Ng -	Nanograma
Nm -	Nanômetro
OMS -	Organização Mundial de Saúde
OPV -	Oral Poliovirus Vaccine
ORF -	Open Reading Frame

## LISTA SIGLAS

Pb -	Pares de bases
PCR -	Polymerase Chain Reaction
PEV -	Enterovírus Suíno
Phe -	Fenilalanina
ppm -	Partes por milhão
Pro -	Prolina
PV -	Poliovírus
PVR-Tg -	Transgenic mice expressing the Human Poliovirus Receptor
RCT -	Replicative Capacity at elevated temperatures
RD -	Cell line derived from human rhabdomyosarcoma
RFLP-PCR -	Restriction Fragment Length Polymorphism – Polymerase Chain Reaction
RNA -	Ácido Ribonucléico
RNAm -	RNA mensageiro
rpm -	Rotações por minuto
RT-PCR -	Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
SDS -	Sodium Dodecyl Sulfate
Ser -	Serina
SHA -	Sequence Heterogeneity Assay
SNC -	Sistema Nervoso Central
TAE -	Tampão tris-acetato EDTA
TBE -	Tampão tris-borato EDTA
Thr -	Treonina
Tyr -	Tirosina
U -	Uracila
UV -	Luz Ultravioleta
Val -	Valina
VAPP -	Vaccine Associated Paralytic Poliomyelitis
VDPVs -	Vaccine-Derived Poliovirus
Vero -	African green monkey Kidney cells
VPg -	Virion Protein genome linked
WHO -	World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01: Quadro epidemiológico revelando a presença de poliovírus selvagem no mundo.....	02
FIGURA 02: Estrutura secundária dos enterovírus.....	09
FIGURA 03A: Estrutura tridimensional do vírus da poliomielite tipo 1.....	10
FIGURA 03B: Simetria icosaédrica dos poliovírus.....	10
FIGURA 04: Desenho esquemático da organização genômica e do processamento proteolítico dos picornavírus.....	11
FIGURA 05: Esquema demonstrando o ciclo de infecção dos picornavírus.....	14
FIGURA 06: Patogenia dos enterovírus.....	15
FIGURA 07: Surtos de polio associados com a circulação de poliovírus derivado da vacina.....	21
FIGURA 08: Localização dos principais nucleotídeos atenuantes e substituições de aminoácidos na cepa Sabin 1.....	28
FIGURA 09: Localização dos principais nucleotídeos atenuantes e substituições de aminoácidos na cepa Sabin 2.....	32
FIGURA 10: Localização dos principais nucleotídeos atenuantes e substituições de aminoácidos na cepa Sabin 3.....	36
FIGURA 11: Perfil eletroforético, em gel de acrilamida 1%, dos produtos amplificados, por reação de PCR, utilizando o par de <i>primers</i> EVR e EVF.....	71

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 12: Perfil eletroforético, em gel de acrilamida 1%, dos produtos amplificados, por reação de PCR, utilizando o par de <i>primers</i> PANPVR e PANPVF.....	72
FIGURA 13: Perfil eletroforético, em gel de acrilamida 1%, dos produtos amplificados, por reação de PCR, utilizando o par de <i>primers</i> PVR1, 2 e 3 e PVF1, 2 e 3.....	73
FIGURA 14: Perfil eletroforético, em gel de acrilamida 1%, dos produtos amplificados, por reação de PCR, utilizando o par de <i>primers</i> PVSabinR1, 2 e 3 e PVSabin1, 2 e 3.....	74
FIGURA 15: Perfil eletroforético, em gel de agarose 1%, dos produtos amplificados, por reação de PCR, utilizando o par de <i>primers</i> Q8 e Y7.....	74
FIGURA 16: Perfil eletroforético, em gel de agarose 1%, dos produtos amplificados, por PCR, utilizando o par de <i>primers</i> EVR e S11S.....	75
FIGURA 17: Perfil eletroforético, em gel de poliacrilamida, dos produtos amplificados, por PCR, utilizando <i>REC-primer</i> S1-REC.....	76
FIGURA 18: Perfil eletroforético, em gel de poliacrilamida, dos produtos amplificados, por PCR, utilizando <i>REC-primers</i> S2-REC.....	76
FIGURA 19: Perfil eletroforético, em gel de poliacrilamida, dos produtos amplificados, por PCR, utilizando <i>REC-primers</i> S3-REC.....	77
FIGURA 20: Alinhamento das seqüências nucleotídicas de VP1.....	83
FIGURA 21: Alinhamento das seqüências de aminoácidos da região de VP1.....	87

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Classificação dos enterovírus humanos.....	07
TABELA 02: Diferenças nucleotídicas observadas nas posições 480 e 525 da região 5'-NCR dos poliovírus tipo 1 isolados, em relação à cepa padrão P1/Sabin.....	78
TABELA 03: Diferenças nucleotídicas observadas na posição 481 da região 5'-NCR dos poliovírus tipo 2 isolados, em relação à cepa padrão P2/Sabin.....	79
TABELA 04: Diferenças nucleotídicas observadas na posição 472 da região 5'-NCR dos poliovírus tipo 3 isolados, em relação à cepa padrão P3/Sabin.....	80
TABELA 05: Substituições nucleotídicas e de aminoácidos observadas na região do gene da proteína VP1 de isolados do sorotipo 2 quando comparados com a cepa vacinal P2/Sabin Padrão.....	82
TABELA 06: Substituições nucleotídicas e de aminoácidos observadas na região do gene da proteína VP1 de isolados do sorotipo 3 quando comparados com a cepa vacinal P3/Sabin Padrão.....	82

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	HISTÓRICO.....	03
1.2	CLASSIFICAÇÃO.....	06
1.3	COMPOSIÇÃO VIRAL.....	08
1.4	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.....	11
1.5	CICLO REPLICATIVO VIRAL.....	12
1.6	PATOGENIA.....	14
1.7	PROFILAXIA.....	16
1.8	POLIOMIELITE PARALÍTICA ASSOCIADA À VACINA.....	17
1.9	POLIOVÍRUS DERIVADO DA VACINA.....	19
1.10	INSTABILIDADE DO GENOMA DOS POLIOVÍRUS.....	21
1.10.1	<b>Bases moleculares da atenuação e da reversão à neurovirulência da cepa vacinal P1/Sabin.....</b>	<b>23</b>
1.10.1.1	Modificações genômicas em poliovírus tipo 1 isolados de casos de poliomielite associados à vacina e de indivíduos vacinados saudáveis.....	28
1.10.2	<b>Bases moleculares da atenuação e da reversão à neurovirulência da cepa vacinal P2/Sabin.....</b>	<b>30</b>

## SUMÁRIO

1.10.2.1	Modificações genômicas em poliovírus tipo 2 isolados de casos de poliomielite associados à vacina e de indivíduos vacinados saudáveis.....	32
1.10.3	<b>Bases moleculares da atenuação e da reversão à neurovirulência da cepa vacinal P3/Sabin.....</b>	<b>34</b>
1.10.3.1	Modificações genômicas em poliovírus tipo 3 isolados de casos de poliomielite associados à vacina e de indivíduos vacinados saudáveis.....	36
1.11	RECOMBINAÇÃO.....	37
1.12	POLIOVÍRUS DERIVADO DA VACINA – RECOMBINAÇÃO.....	38
1.13	HISPANHOLA.....	42
1.14	FILIPINAS.....	45
1.15	MADAGASCAR.....	47
1.16	EGITO.....	48
1.17	POLIOVÍRUS DERIVADO DA VACINA ASSOCIADO À IMUNODEFICIÊNCIA.....	49
1.18	POLIOVÍRUS DERIVADO DA VACINA – MEIO AMBIENTE.....	52
2	<b>RELEVÂNCIA.....</b>	<b>56</b>
3	<b>OBJETIVOS</b>	
3.1	OBJETIVO GERAL.....	57

## SUMÁRIO

3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	
4.1	AMOSTRAS AMBIENTAIS.....	58
4.2	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	58
4.2.1	<b>Redução dos efeitos citotóxicos dos concentrados finais das amostras de água de esgoto.....</b>	<b>59</b>
4.2.2	<b>Eliminação de bactérias e fungos dos concentrados finais das amostras de água de esgoto e certificação da esterilidade.....</b>	<b>59</b>
4.3	ISOLAMENTO VIRAL.....	59
4.4	PREPARAÇÃO DE ESTOQUE VIRAL.....	60
4.5	IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROVÍRUS POR RT-PCR.....	60
4.6	CONFIRMAÇÃO DOS ISOLADOS COMO POLIOVÍRUS.....	61
4.7	DETERMINAÇÃO DO SOROTIPO DE POLIOVÍRUS ATRAVÉS DE RT-PCR.....	62
4.8	DIFERENCIAÇÃO INTRATÍPICA DOS POLIOVÍRUS ISOLADOS.....	63
4.9	CARACTERÍSTICAS GENÔMICA DOS POLIOVÍRUS ISOLADOS.....	64
4.9.1	<b>Extração do RNA viral.....</b>	<b>64</b>

## SUMÁRIO

4.9.2	<b>Síntese de cDNA</b> .....	65
4.9.3	<b>Reação de RT-PCR para amplificação da região 5'-NCR do genoma dos poliovírus</b> .....	65
4.9.4	<b>Reação de RT-PCR para amplificação do gene VP1 do genoma dos poliovírus</b> .....	66
4.9.5	<b>Reação de RT-PCR para amplificação da região 2C e 3D do genoma dos poliovírus</b> .....	67
4.9.6	<b>Visualização dos produtos amplificados</b> .....	67
4.9.6.1	Gel de Acrilamida.....	67
4.9.6.2	Gel de Agarose.....	68
4.9.7	<b>Purificação dos produtos amplificados</b> .....	68
4.9.8	<b>Avaliação quantitativa dos produtos de PCR purificados</b> .....	69
4.9.9	<b>Seqüenciamento dos produtos de RT-PCR</b> .....	69
4.9.10	<b>Purificação dos produtos de <i>Cycle Sequencing</i></b> .....	70
4.9.11	<b>Análise das seqüências obtidas nas reações de <i>Cycle Sequencing</i></b> .....	70
4.9.12	<b>Programa utilizados para análise das seqüências</b> .....	70
5	<b>RESULTADOS</b>	

## SUMÁRIO

5.1	PROPAGAÇÃO VIRAL EM CULTURA CELULAR.....	71
5.2	IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROVÍRUS ISOLADOS POR RT-PCR.....	71
5.3	CONFIRMAÇÃO DOS ISOLADOS COMO POLIOVÍRUS.....	71
5.4	IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS DE POLIOVÍRUS POR RT-PCR.....	72
5.5	MULTIPLEX RT-PCR PARA A DIFERENCIAÇÃO INTRATÍPICA DOS POLIOVÍRUS IDENTIFICADOS.....	73
5.6.	AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO VP1 DO GENOMA DOS POLIOVÍRUS ISOLADOS.....	74
5.7	AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 5'-NCR DO GENOMA DOS POLIOVÍRUS ISOLADOS.....	75
5.8	AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 2C E 3D DO GENOMA DOS POLIOVÍRUS TIPO 1.....	75
5.9	AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 2C E 3D DO GENOMA DOS POLIOVÍRUS TIPO 2.....	76
5.10	AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 2C E 3D DO GENOMA DOS POLIOVÍRUS TIPO 3.....	77
5.11	SEQÜENCIAMENTO NUCLEOTÍDEO.....	77
5.11.1	<b>Seqüenciamento e análise da região 5'-NCR dos poliovírus tipo 1 isolados.....</b>	<b>77</b>

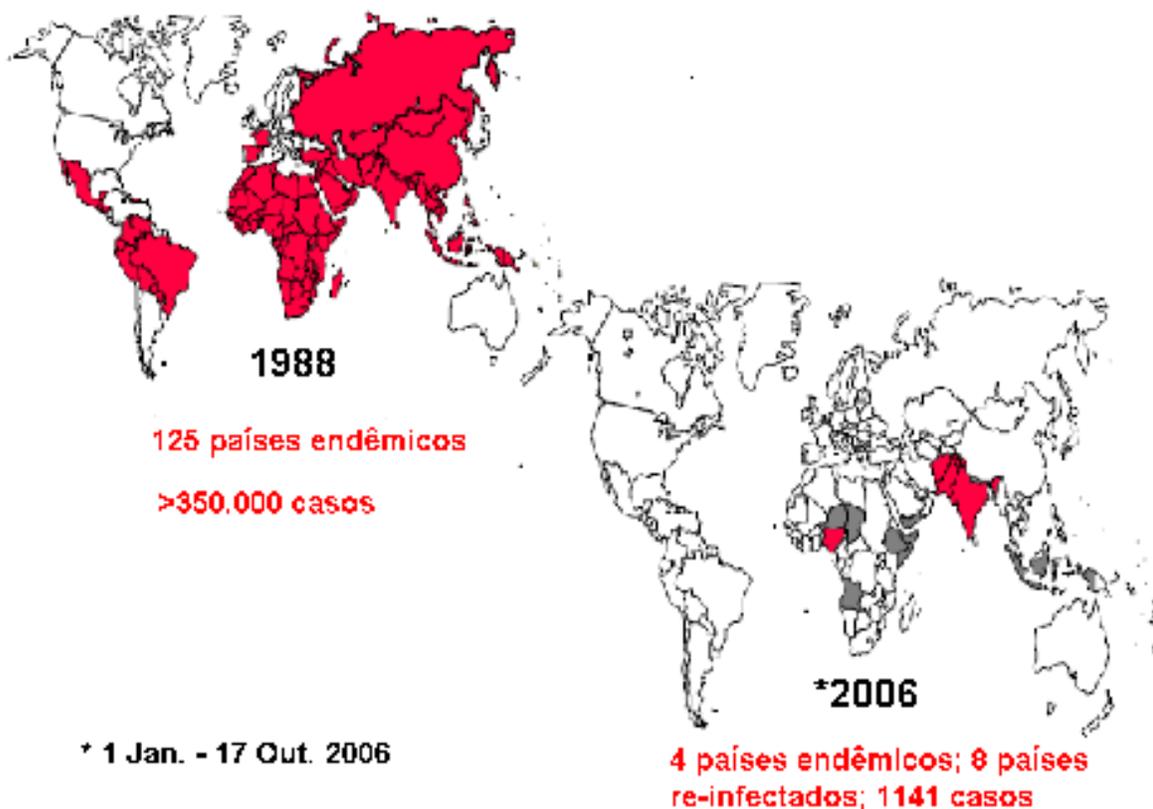
## SUMÁRIO

5.11.2	<b>Seqüenciamento e análise da região 5'-NCR dos poliovírus tipo 2 isolados.....</b>	<b>78</b>
5.11.3	<b>Seqüenciamento e análise da região 5'-NCR dos poliovírus tipo 3 isolados.....</b>	<b>79</b>
5.11.4	<b>Seqüenciamento e análise da região VP1 dos poliovírus.....</b>	<b>80</b>
5.11.5	<b>Poliovírus tipo 1.....</b>	<b>80</b>
5.11.6	<b>Poliovírus tipo 2.....</b>	<b>81</b>
5.11.7	<b>Poliovírus tipo 3.....</b>	<b>81</b>
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>91</b>
7	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>98</b>
8	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>99</b>

A poliomielite é uma doença infecciosa aguda que ocorre seguida a uma infecção por um dos três sorotipos de poliovírus. Esta doença caracteriza-se por uma paralisia flácida aguda de início súbito, resultante da destruição de neurônios motores por ação viral.

Hoje a poliomielite é uma doença rara em todos os países desenvolvidos e na quase totalidade dos países em desenvolvimento. Em 1988, os poliovírus selvagens eram endêmicos em 125 países; em agosto de 2006, estes agentes estavam restritos a apenas quatro países: Afeganistão, Índia, Paquistão e Nigéria. O número de casos de poliomielite notificados sofreu também uma drástica redução, passando de 350.000 casos em 1988 para 1115 casos em 2006, sendo 99% de todos os casos ocorrendo na Índia, Nigéria e Paquistão (WHO, 2006). Este imenso sucesso é atribuído ao Programa Global de Erradicação da Poliomielite, desenvolvido pelo Programa de Imunização da OMS (Organização Mundial da Saúde) que tem alcançado uma redução de mais de 99% na incidência de casos de poliomielite paralítica e um enorme decréscimo na circulação de poliovírus selvagens. Atualmente, a prioridade mais urgente é a eliminação de poliovírus selvagem em áreas reservatórios na África e na Ásia.

O sucesso deste programa não poderia ter sido alcançado sem a utilização da vacina oral contra a poliomielite (OPV), formulada pelo Dr. Albert Sabin. A OPV é facilmente administrada, facilitando seu uso disseminado, fazendo seus vacinados resistentes à infecção pelo poliovírus selvagem e efetivamente bloqueando a sua transmissão, quando utilizada nas campanhas de imunização em massa. Além disso, a proteção é também induzida contra a pólio através de uma imunidade humoral. O vírus vacinal pode se espalhar, imunizando desta forma comunicantes não vacinados com os receptores da OPV (Figura 01) (WHO, 2003).



Fonte: [www.who.int](http://www.who.int)

**Figura 01: Quadro epidemiológico revelando a presença de poliovírus selvagem no mundo.** O mapa mostra o resultado da campanha de erradicação da poliomielite pela OMS (WHO, 1988; 2001).

As vantagens e desvantagens relativas ao momento e ao modo de se interromper a vacinação com a vacina oral, tão logo o mundo seja certificado como livre da circulação de poliovírus selvagens, devem ser consideradas. A maior vantagem nesta estratégia é óbvia: a prevenção de casos de poliomielite associada à vacina, que ocorrem numa proporção de um caso por aproximadamente  $10^6$  doses de vacinas distribuídas. Por outro lado, a interrupção da vacinação irá inevitavelmente resultar num dramático crescimento de uma população não imunizada e criar a oportunidade para uma rápida reintrodução e disseminação de poliovírus dentro de uma população de risco (WOOD; SUTTER; DOWDLE, 2000).

Com a erradicação dos poliovírus selvagens, tem sido sugerido que a transmissão potencial de poliovírus derivados da OPV poderia ter implicações para sua erradicação. Na verdade, surtos de poliomielite parálitica causados por vírus derivados da vacina já foram detectados em três regiões geograficamente distintas. Na América Central, onde o poliovírus vacinal do tipo 1 foi capaz de sofrer mutações, em uma população com baixos índices de

cobertura vacinal, duas características puderam ser observadas no genoma das amostras virais isoladas: 1) os vírus derivados da vacina possuíam várias mutações correlacionadas com a reversão ao fenótipo neurovirulento e 2) todas as amostras virais eram recombinantes em que partes do genoma viral foram substituídas por seqüências genômicas derivadas de outros enterovírus ou de outro sorotipo de poliovírus vacinal. Nos últimos quatro anos outros surtos de poliomielite associados a poliovírus circulantes derivados da vacina (cVDPV) ocorreram nas Filipinas (2001) e em Madagascar (2001- 2002). Estudos retrospectivos também têm detectado a circulação de cVDPV endêmicos no Egito (1988-1993), onde o poliovírus vacinal do tipo 2 foi o responsável pelos casos de poliomielite (KEW et al., 2002).

Com a finalidade de aumentar a sensibilidade de detecção de cVDPV a Rede Mundial de Laboratórios para a Poliomielite implantou novos requisitos de análise para todos os isolados de poliovírus submetidos a investigação (MMWR, 2000). Este enfoque permitiu reconhecer rapidamente os surtos de cVDPV das Filipinas e de Madagascar, o que não foi possível com os surtos anteriores. O risco potencial do surgimento de cVDPV têm aumentado extraordinariamente nos últimos anos, devido à tendência de diminuição das coberturas vacinais em áreas onde a circulação de poliovírus foi interrompida.

O surgimento de cVDPV ressalta a importância da manutenção de altas taxas de cobertura vacinal, crucial para a rápida eliminação dos últimos focos de circulação do poliovírus selvagens existentes no mundo. Devido à capacidade das amostras de poliovírus vacinais de acumularem mutações e reverterem ao fenótipo neurovirulento, a análise genômica de amostras de poliovírus derivados da vacina Sabin isolados de casos de paralisia flácida aguda e do meio ambiente constitui-se em ferramenta importante para o controle da poliomielite e possui enorme implicação para o sucesso do Programa de Erradicação da Poliomielite dirigido pela OMS.

## 1.1 HISTÓRICO

A história dos enterovírus é praticamente toda baseada no estudo dos poliovírus. De fato, muitos dos marcos no estudo dos poliovírus são marcos não somente para o estudo dos outros enterovírus, mas para toda a virologia (PALLANSCH & ROSS, 2001).

Acredita-se que a poliomielite seja uma doença antiga, com base na descrição de um jovem com um membro atrofiado, compatível com a seqüela da poliomielite, em um artefato, datado do segundo milênio a.C., no interior de uma pirâmide no Egito. Informações referentes a esta doença anteriores ao século XVIII são difíceis de serem encontradas. A primeira descrição clara em inglês é a narrativa biográfica de paralisia aguda resultando em deficiência

motora sofrida por Sir Walter Scott em 1772, no segundo ano da sua vida, no livro *“Memories of the life of Sir Walter Scott, Bart”*, escrito por J. G. Lockhart em 1837, como citado por MODLIN (1995).

Em 1840, VON HEINE publicou uma monografia descrevendo especificamente a enfermidade. Suas contribuições, bem como as publicações posteriores de MEDIN na Suécia levaram a poliomielite paralítica a ser conhecida como a doença de HEINE-MEDIN. CHARCOT posteriormente mostrou que a paralisia era acompanhada pela perda de neurônios motores no corno anterior da medula, e esse achado gerou o termo da patologia de “poliomielite” (em grego *polios* significa cinza e *mielos* medula) (MOORE & MORENS, 1984; MODLIN, 1995).

O início do século 20 marca uma nova era nas investigações sobre a poliomielite, com a compreensão sobre a infecção natural desta doença. WICKMAN e colaboradores descreveram a poliomielite como uma doença transmissível, a importância de indivíduos assintomáticos na transmissão dos poliovírus, e o papel da infecção entérica na patogênese da doença. O papel do trato gastrointestinal no início e na propagação da infecção dos poliovírus foi posteriormente confirmado por TRASK e colaboradores. Em 1908, LANDSTEINER e POPPER induziram a poliomielite em macacos do tipo *Cynocephalus* após inoculação intraperitoneal utilizando um filtrado de tecido neural humano de um caso de poliomielite fatal. Apesar destes progressos, existiam vários conceitos errôneos sobre a poliomielite, que inicialmente confundiram os cientistas e direcionaram mal as tentativas de controle dessa enfermidade. Estes conceitos errôneos incluíam a crença de que os vírus eram exclusivamente neurotrópicos, que a nasofaringe era o principal sítio de entrada do vírus no interior do Sistema Nervoso Central (SNC), e que os vírus se espalhavam pelo sistema nervoso através do nervo olfatório, antes da viremia. Como resultado dessas orientações e a falha nos esforços para a imunização, alguns com resultados desastrosos (PAUL, 1971), existia, em meados do século 20, uma atmosfera de pessimismo acerca de um eventual controle da poliomielite, até mesmo entre os cientistas que trabalhavam no campo. Em 1945, BURNET escreveu: *“O problema prático de prevenir a paralisia infantil não tem sido resolvido. Sempre haverá a dúvida se ela será resolvida”*. A eventual descoberta de que a via de entrada do vírus era a rota oral/gastrointestinal e de que a doença do SNC seguia uma viremia aumentaram as esperanças para uma imunização efetiva (PALLANSCH & ROSS, 2001).

Durante um surto de doença paralítica ocorrido em 1948, DALFORD e SICKLES isolaram um vírus, previamente desconhecido, a partir de amostras fecais de duas crianças. Estes agentes induziam paralisia em camundongos recém nascidos, ao contrário dos poliovírus, que normalmente causam doença apenas em primatas. Estes vírus foram

denominados coxsackievírus (mais tarde coxsackievírus do grupo A; CA) referindo-se à primeira região geográfica do isolamento. Juntamente com esses vírus foram identificados também outros vírus que causavam um tipo de paralisia espástica, diferente da descrita por Dalford e Sickles, observada quando estes vírus eram inoculados em camundongos, sendo este denominado coxsackievírus B (HYYPPIA et al., 1997).

Baseados em outros estudos, ENDERS, WELLER e ROBINS em 1949 realizaram um estudo notável demonstrando a propagação do poliovírus em cultura de células não neurais. Estas investigações tiveram implicações para toda a virologia, pois indicaram, primeiramente, que os poliovírus podem ser propagados em várias culturas de tecidos que não correspondem aos tecidos infectados durante a doença no Homem e, em segundo lugar, que a biossíntese do poliovírus destrói as células com um efeito citopatogênico específico. Este feito é reconhecido como um evento de grande impacto científico e que abriu as portas para um melhor entendimento acerca dos poliovírus o que permitiu, já na década seguinte, o desenvolvimento de vacinas. Este trabalho levou os autores acima citados a serem laureados com o prêmio Nobel de medicina de 1954 (WHITE & FENNER, 1994).

A introdução de técnicas de cultura celular nos laboratórios de virologia permitiu o isolamento de vírus que não se replicavam em modelos experimentais, possibilitando o isolamento de novos enterovírus. Os echovírus foram isolados a partir de amostras fecais, onde poliovírus e coxsackievírus são normalmente encontrados e não possuíam as propriedades patogênicas destes dois subgrupos em modelos experimentais. A denominação foi escolhida pela ausência de associação com doença humana naquela época (ECHO, “*Enteric Cytopathogenic Human Orphan*”) (HYYPPIA et al., 1997).

Na década de 50, o uso de culturas de células de rim de macaco para a propagação dos poliovírus, revelou a presença de vírus *Simian* na forma latente. Investigações posteriores mostraram que alguns destes vírus apresentavam propriedades dos enterovírus e eventualmente 18 sorotipos foram descritos. Ao final da década de 50, foi demonstrada também a presença de enterovírus infectando animais domésticos como o porco e o gado (HYYPPIA et al., 1997).

Testes de neutralização demonstraram que os poliovírus apresentam-se em três sorotipos e, testes sorológicos confirmaram o fato de que a maioria dos indivíduos infectados não manifesta a doença clínica (PALLANSCH & ROSS, 2001).

Em 1955, o Dr. JONAS SALK desenvolveu a vacina inativada contra a poliomielite, utilizando formaldeído (SALK, 1955). O uso intensivo da vacina fez decair a incidência de casos de poliomielite, em muitos países industrializados, diminuindo a transmissão do vírus selvagem. Em 1961, o Dr. ALBERT SABIN desenvolveu uma vacina oral, contendo vírus

atenuados e capaz de induzir uma resposta imune eficaz (SABIN, 1965; SABIN, 1981). Devido à facilidade de administração, a vacina oral contra o poliovírus OPV (“*Oral Poliovirus Vaccine*”), tornou-se a vacina utilizada na maioria dos Programas Nacionais de Imunização do mundo (WHO, 2003).

Trabalhos realizados com poliovírus têm apresentado um contínuo impacto no campo da virologia molecular. Os poliovírus foram os primeiros vírus de animais completamente clonados e seqüenciados (RACANIELLO & BALTIMORE, 1981b), o primeiro vírus animal RNA para o qual um clone infeccioso foi construído (RACANIELLO & BALTIMORE, 1981a), e o primeiro vírus humano que teve sua estrutura tridimensional revelada pela cristalografia de raios X (HOGLE; CHOW; FILMAN, 1985), sendo possivelmente, o mais bem conhecido de todos os vírus do seu gênero (MELNICK, 1996; WIMMER; HELLEN; CAO, 1993). Em 1989, RACANIELLO e colaboradores (MENDELSON; WIMMER; RACANIELLO, 1989) identificaram um receptor para poliovírus (PVR), um achado que foi seguido pela geração de camundongos transgênicos expressando o receptor humano para poliovírus (PVR-Tg) (REN et al., 1990).

## 1.2 CLASSIFICAÇÃO

Os membros da Família *Picornaviridae* tradicionalmente têm sido classificados, identificados, e diferenciados com base nas propriedades físicas e antigênicas, como estabilidade em pH ácido, densidade viral, e por neutralização com antisoros específicos (OBERSTE et al., 2001).

Mais de 200 sorotipos têm sido identificados e nove gêneros foram definidos: *Aphthovirus* (oito sorotipos), *Cardiovirus* (três sorotipos), *Enterovirus* (89 sorotipos), *Hepatovirus* (dois sorotipos), *Parechovirus* (quatro sorotipos), *Rhinovirus* (103 sorotipos), *Erbovirus* (dois sorotipos), *Kobuvirus* (dois sorotipos) e *Teschovirus* (10 sorotipos) sendo que todos possuem representantes que infectam vertebrados (PRINGLE, 1999).

Os gêneros são subdivididos em espécies, por exemplo, o gênero *Enterovirus* é composto por oito espécies: Enterovírus Bovino (BEV; dois sorotipos), Enterovírus Humano A (HEV-A; 12 sorotipos), Enterovírus Humano B (HEV-B; 36 sorotipos), Enterovírus Humano C (HEV-C; 11 sorotipos), Enterovírus Humano D (HEV-D; dois sorotipos), Poliovírus (PV; três sorotipos), Enterovírus Suíno A (PEV-A; um sorotipo), e Enterovírus Suíno B (PEV-B; dois sorotipos) (OBERSTE; MAHER; PALLANSCH, 2002). O vírus da hepatite A (HAV), antes classificado como Enterovírus 72, foi reclassificado em um gênero

separado, *Hepatovirus*, devido a algumas propriedades únicas deste vírus, incluindo diferenças na seqüência nucleotídica e de aminoácidos com outros picornavírus, replicação sem efeito citopático e a existência de apenas um sorotipo (HYYPIA et al., 1997; SANTTI; VAINIOPAA; HYYPIA, 1999; RACANIELLO, 2001).

No gênero *Enterovirus*, as espécies são diferenciadas imunologicamente pela capacidade que soros imunes específicos possuem de neutralizar apenas os vírus homotípicos. Dos 89 sorotipos de enterovírus, 65 possuem a capacidade de infectar o Homem (MELNICK, 1996). Com base na sua patogenicidade em humanos e em animais experimentais, os enterovírus foram classificados em quatro grandes grupos: Poliovírus (PV, três sorotipos), Coxsackievírus grupo A (CA, 23 sorotipos), Coxsackievírus grupo B (CB, seis sorotipos) e Echovírus (28 sorotipos) (SANTTI; VAINIOPAA; HYYPIA, 1999).

Os enterovírus recentemente isolados têm sido denominados através de sistema consecutivo de números: EV 68, 69, 70, e 71 (HYYPIA et al., 1997; OBERSTE et al., 1999a), EV 73 (OBERSTE et al., 2001), EV 74 e 75 (OBERSTE et al., 2004), EV77 e 78 (NORDER et al., 2003), e EV 76, 89, 90 e 91 (OBERSTE et al., 2005).

Uma outra classificação para os enterovírus, com base em dados biológicos e em resultados de experimentos moleculares para a análise do genoma completo viral, bem como das regiões VP1, VP2 e 3D (KING et al., 2000; NORDER et al., 2003; OBERSTE et al., 2001; OBERSTE et al., 2004; OBERSTE et al., 2005), agrupa os enterovírus humanos (HEV) em cinco espécies, como pode ser observado na Tabela 01.

<b>Espécies dos Enterovírus</b>				
<b>Poliovírus</b>	<b>Enterovírus humanos A (HEV-A)</b>	<b>Enterovírus humanos B (HEV-B)</b>	<b>Enterovírus humanos C (HEV-C)</b>	<b>Enterovírus humanos D (HEV-D)</b>
PV1	CVA2-A8	CVB1-B6	CVA1	EV68
PV2	CVA10	CVA9	CVA11	EV70
PV3	CVA12	Echo1-7	CVA13	
	CVA14	Echo9	CVA15	
	CVA16	Echo11-21	CVA17-22	
	EV71	Echo24-27	CVA24	
	EV76	Echo29-33		
	EV89	EV69		
	EV90	EV73		
	EV91	EV74		
		EV75		
		EV77		
		EV78		

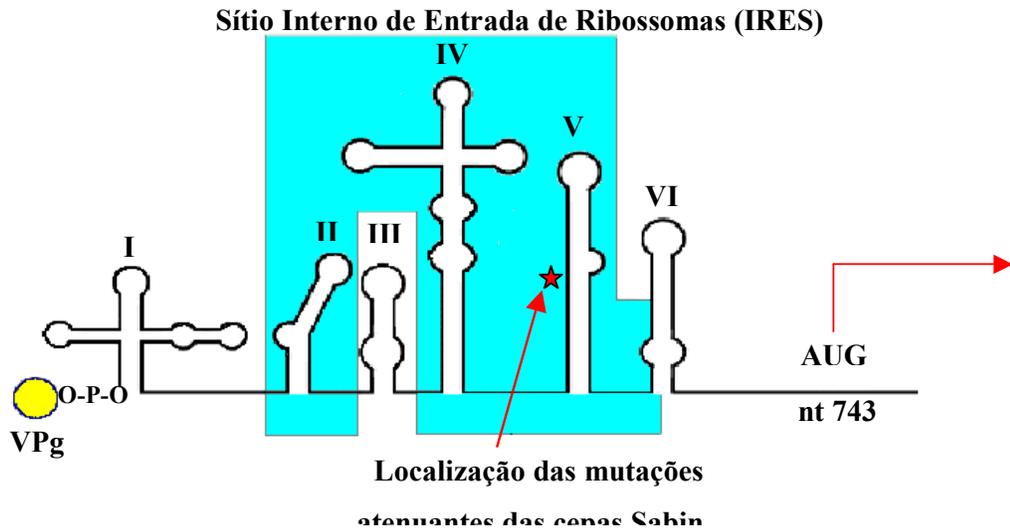
**Tabela 01: Classificação dos enterovírus humanos.** Legenda: PV – Poliovírus; CVA – Coxsackievírus A; CVB – Coxsackievírus B; EV – Enterovírus; Echo – Echovírus. Fonte: ECTVdB – The Universal Virus Database, version 3.

Poliovírus, membros do gênero *Enterovirus*, pertencente à família *Picornaviridae* estão agrupados em três sorotipos designados 1, 2 e 3, com base na antigenicidade do capsídeo. São partículas pequenas, esféricas, não envelopadas, com diâmetro medindo 30 nm (RACANIELLO, 2001). A composição química destes vírus é composta de 30% de ácido nucléico e 70% de proteínas (KITAMURA et al., 1981). Sua estrutura genômica consiste de uma fita simples de RNA, de polaridade positiva, que funciona como RNAm, com aproximadamente 7,5 Kb, e peso molecular de aproximadamente  $8,5 \times 10^6$  Da.

O RNA viral apresenta uma pequena proteína VPg (“*Virion Protein genome*”), ligada covalentemente à extremidade 5’ não codificante – NCR (“*Non Coding Region*”). Esta região possui cerca de 740 nucleotídeos e precede a fase de leitura aberta. Uma característica interessante dos enterovírus é a presença de múltiplos códons AUG na região 5’-NCR do RNA viral, variando de 6 a 8 códons AUG dependendo do sorotipo. O genoma viral termina em uma extremidade 3’ não codificante (3’-NCR), seguida de uma cauda poliriboadenínica (poli-A) (STANWAY, 1990; HELLEN & WIMMER, 1995; RACANIELLO, 2001).

A extremidade 5’-NCR está envolvida na replicação e tradução do genoma do vírus, enquanto a extremidade 3’-NCR está envolvida na replicação do RNA viral (LEVY; FRAENKEL-CONRAT; OWENS, 1994).

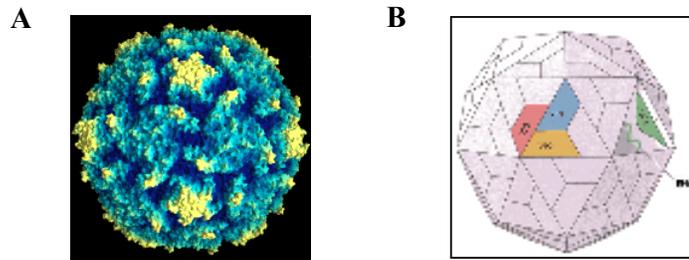
Os primeiros nucleotídeos ( $\cong 740$ ) que compõem o genoma dos enterovírus, a partir da extremidade 5’ terminal, formam porções extremamente conservadas e outras extremamente variáveis entre os sorotipos de enterovírus. Nesta região rica em estruturas secundárias, está localizado o sítio de ligação para os ribossomos onde se inicia a tradução, o IRES (“*Internal Ribosome Entry Site*”), sendo denominada de região 5’-NCR, pelo fato do códon iniciador estar localizado no final desta região, em torno do nucleotídeo 740 (HELLEN & WIMMER, 1995). A estrutura secundária da região 5’-NCR define seis domínios numerados de I a VI (WIMMER; HELLEN; CAO, 1993), correspondendo uma estrutura altamente conservada cuja estrutura secundária possui uma conformação característica (PILIPENKO et al., 1989; SKINNER et al., 1989). Os domínios II, IV, e V e parte do domínio VI constituem-se no sítio de entrada do ribossoma o qual permite a iniciação cap-independente da translação do genoma viral (GROMEIER et al., 1999). A Figura 02 ilustra a estrutura secundária dos enterovírus.



**Figura 02: Estrutura Secundária dos Enterovírus.** O Sítio Interno de Entrada de Ribossomas está em caixa azul ([www.blc.arizona.edu/mary/411/Modules/eukinit.html](http://www.blc.arizona.edu/mary/411/Modules/eukinit.html)).

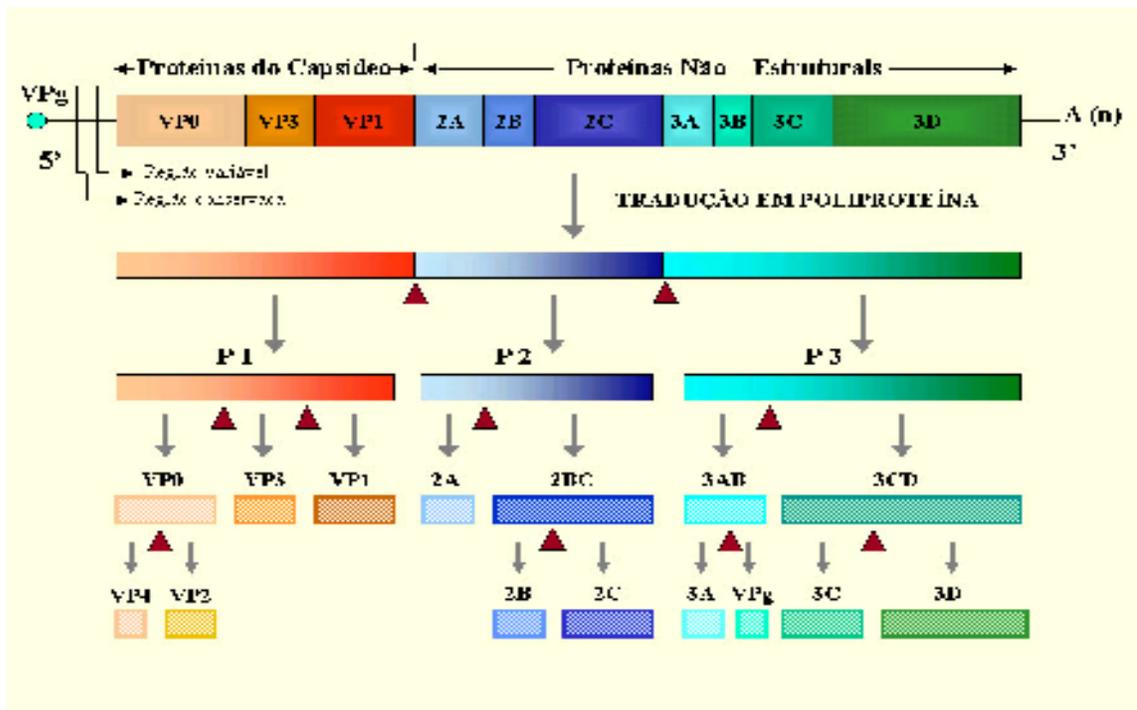
O genoma dos poliovírus é monocistrômico apresentando uma longa região não codificante de 711 a 822 nucleotídeos e uma única fase de leitura (ORF), codificando uma poliproteína de 250 kDa, clivada durante a tradução do genoma viral. Essas clivagens são realizadas por proteinases codificadas pelo próprio vírus e que geram diversos produtos protéicos com diferentes funções, como as proteínas do capsídeo, proteinases e RNA polimerases (RUECKERT, 1996; WIMMER; HELLEN; CAO, 1993). O capsídeo apresenta uma estrutura icosaédrica formada por 60 subunidades idênticas (protômeros), onde está acomodado o genoma viral. Cada protômero é formado pelos quatro polipeptídeos estruturais, VP1 (35,5 kDa), VP2 (30,0 kDa), VP3 (26,4 kDa) e VP4 (7,4 kDa), produtos da proteólise da do precursor P1 da poliproteína viral (Figura 03 A) (RUECKERT, 1996; WIMMER; HELLEN; CAO, 1993; HELLEN & WIMMER, 1995).

A estrutura das proteínas de capsídeo tem sido revelada através da cristologia por raios-X (Figura 03 B) (HOGLE; CHOW; FILMAN et al., 1985).



**Figura 03: (A) Estrutura tridimensional do vírus da poliomielite tipo 1.** Estrutura obtida por meio de cristalografia de raios-X com resolução de 2.9 Å. As regiões amarelas evidenciam os pontos de interação da proteína VP1 (HOGLE et al., 1985). **(B) Simetria icosaédrica dos poliovírus.** Desenho esquemático do poliovírus mostrando os nomes e a localização das proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3 e VP4) e do RNA viral. Uma das faces icosaédricas foi removida para expor a posição da VP4 e do RNA viral (FLINT et al., 2000).

A poliproteína pode ser dividida, de acordo com os produtos codificados, em três regiões: P1, P2 e P3. Em uma seqüência de reações proteolíticas, a região P1, precursora das proteínas do capsídeo, é clivada em três polipeptídeos: VP0, VP3 e VP1, que permanecem associados sob a forma de protômeros, mas que rapidamente se agregam para formar pentâmeros de (VP0, VP3 e VP1). Os pentâmeros a seguir, se agregam para formar o procapsídeo [(VP0, VP3 e VP1)]. A etapa final é a clivagem de maturação de VP0 em VP4 e VP2, por um processo autocatalítico, provavelmente ocorrendo concomitantemente ao empacotamento do RNA viral. O processamento de VP0 está associado à aquisição da infectividade e ao aumento da estabilidade da partícula viral. Os polipeptídeos VP1, VP2 e VP3 estão expostos na superfície do virion, enquanto VP4 apresenta-se internalizado, associado ao RNA viral (LEVY; FRAENKEL-CONRAT; OWENS, 1994; HELLEN & WIMMER, 1995). Os epítomos responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes estão localizados principalmente em VP1, a proteína mais superficial, e a mais exposta (MOORE & MORENS, 1984). A Figura 04 mostra a localização, no genoma dos enterovírus, dos genes que são traduzidos nas proteínas supracitadas.



**Figura 04: Desenho esquemático da organização genômica e do processamento proteolítico nos picornavírus.** O RNA está associado com a proteína VPg localizada na extremidade 5'. O genoma possui polaridade positiva e codifica uma poliproteína precursora. A poliproteína é clivada durante a tradução pelas proteases virais, para produzir proteínas estruturais e não estruturais. A proteína P1 é clivada nas proteínas do capsídeo viral e as proteínas P2 e P3 são clivadas pra formar proteases e proteínas que participam da síntese do RNA viral. Adaptado por COSTA et al., 1999 de FLINT et al., 2000.

#### 1.4 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Os poliovírus são resistentes a detergentes fortes como o SDS, enzimas proteolíticas, pH ácido bem como a todos os antibióticos e agentes quimioterápicos conhecidos. São termolábeis, sendo destruídos, rapidamente, pela exposição a 50 °C por uma hora, exceto em presença de cloreto de magnésio, estabilizando-se por anos à temperatura de -70 °C e extenso período em -20 °C. Permanecem ativos por semanas a 4 °C e por alguns dias à temperatura ambiente. São resistentes a pH ácido (pH 3 a 5 por uma a três horas), às enzimas proteolíticas e a alguns desinfetantes comuns utilizados em laboratório como o etanol a 70%, Lysol a 5%, isopropanol, éter e compostos de amônio quaternário (MELNICK, 1996). Na ausência de agentes orgânicos de origem protéica, na presença dos quais, o vírus pode associar-se e derivar-se, protegendo-se contra a inativação, os enterovírus são inativados rapidamente por formaldeído a 0,3%, ácido clorídrico a 0,1 N, cloro residual livre (0,3 ppm a 0,5 ppm), bromo

residual livre ou iodo (aproximadamente 0,5 ppm por 10 minutos de contato) e luz ultravioleta (MOORE & MORENS, 1984; MELNICK, 1996).

## 1.5 CICLO REPLICATIVO VIRAL

O início do ciclo replicativo ocorre por uma interação vírus-célula hospedeira, através da adsorção do vírion a receptores celulares específicos presentes na membrana plasmática. Os poliovírus utilizam a proteína de superfície CD155 como receptor para a entrada na célula (RACANIELLO, 2001).

Após a adsorção, o vírus é então internalizado e desencapsulado. A internalização se dá, por endocitose, em alguns pontos da superfície celular. As partículas virais são revestidas internamente por clatrin, onde os receptores estão concentrados, ocorrendo a invaginação e a posterior formação de vesículas recobertas por clatrin. A acidificação no interior das vesículas, devido à atuação da bomba de prótons, provoca mudanças na estrutura do vírion, resultando na liberação de VP4 e no aparecimento de sítios hidrofóbicos presentes na região amino-terminal de VP1, ambos escondidos anteriormente na região interna do capsídeo viral. A fusão da membrana lipídica com os sítios hidrofóbicos da proteína capsídica permite a formação de um poro e a conseqüente transferência do RNA do vírion para o citosol, onde ocorre inteiramente a sua replicação. A proteína VPg é então removida do RNA viral por enzimas celulares. O RNA, agindo como RNAm, é automaticamente traduzido, sem interrupção, em uma única poliproteína que, ainda no processo de formação, é clivada autocataliticamente nos intermediários P1, P2 e P3 (PORTER, 1993; RUECKERT, 1996; RACANIELLO, 2001). O processamento da poliproteína precursora é realizado cotransducionalmente por reações intramoleculares (*in cis*), as quais são chamadas de clivagens primárias, seguidas pelo processamento secundário *in cis* ou *in trans* (intermolecular). O evento inicial na seqüência de clivagens é a liberação do precursor P1 da poliproteína nascente pela protease 2A (2A<sup>pro</sup>). A 2A<sup>pro</sup> é autocataliticamente liberada da poliproteína por clivagem cotransducional na sua terminação amino. Esta clivagem é um pré-requisito para o processamento proteolítico da região precursora do capsídeo. Já a protease 3C (3C<sup>pro</sup>) é responsável pela clivagem primária entre 2C e 3A, separando os segmentos P2 e P3, e pela maioria das clivagens secundárias ocorridas nos intermediários P1, P2 e P3. A forma precursora 3CD<sup>pro</sup> parece catalisar eficientemente algumas clivagens ocorridas no segmento P1 (PORTER, 1993; HELLEN & WIMMER, 1995). O precursor P1 é clivado para produzir, inicialmente, VP0, VP1 e VP3 e, finalmente, as quatro proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e

VP4. Os segmentos P2 e P3 são processados para darem origem às proteínas não estruturais envolvidas no processamento protéico (2A<sup>pro</sup>, 3C<sup>pro</sup>, 3CD<sup>pro</sup>) e na replicação do genoma (2B, 2C, 3AB, 3B<sup>VPg</sup>, 3D<sup>pol</sup>). Nessa etapa da síntese da poliproteína viral, são formados polissomos contendo mais de 40 ribossomos (PORTER, 1993; RUECKERT, 1996; RACANIELLO, 2001).

Estudos sobre o processo de tradução picornaviral demonstraram a presença, na região 5'-NCR do genoma viral, de uma seqüência correspondente a um sítio interno de entrada de ribossomos, o IRES, o qual consiste de um elemento regulatório de aproximadamente 450 a 600 nucleotídeos. A subunidade 40S ribossomal liga-se ao RNAm através do IRES e “desliza” até o códon de iniciação AUG. O processo de tradução dos picornavírus, cujo mecanismo é direcionado pelo IRES e cap-independente, parece requerer a presença de diferentes fatores de iniciação de tradução eucarióticos (eIF) (MEYER et al., 1995; RACANIELLO, 2001).

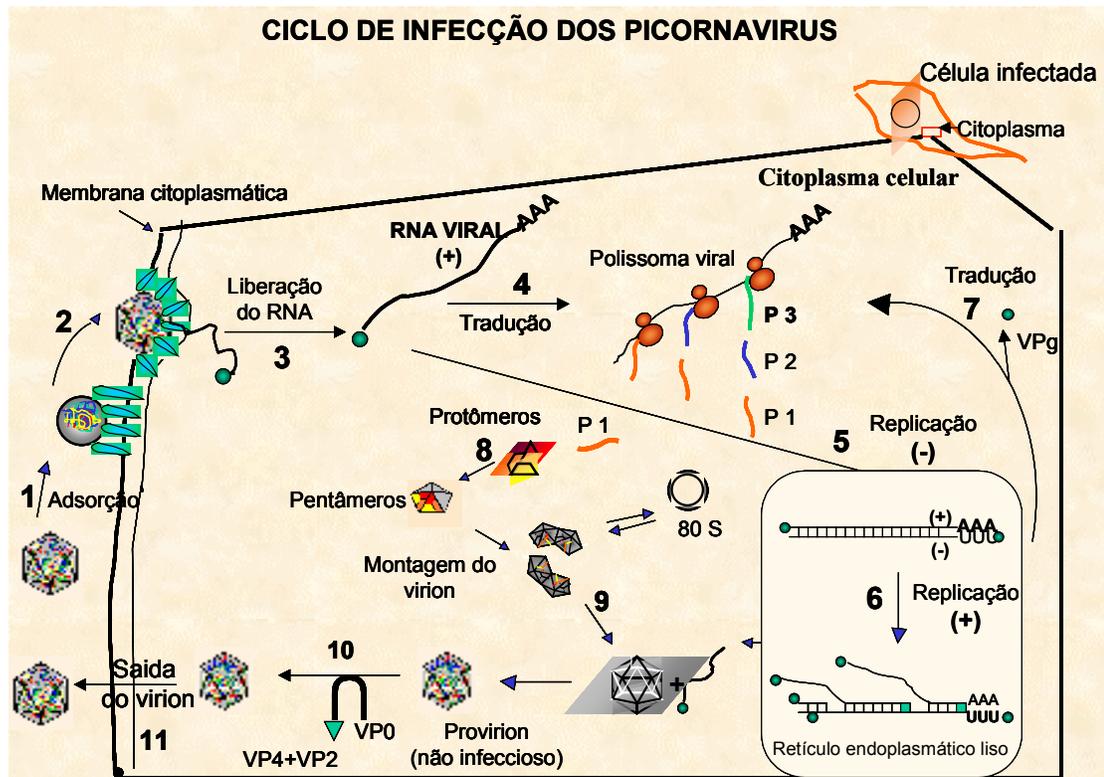
A síntese do genoma viral é obtida por uma seqüência de eventos onde participam as moléculas de RNA viral, atuando como molde, e as RNA polimerases codificadas pelos vírus, além de outras proteínas virais e celulares. Todo esse processo ocorre no interior do citoplasma, fortemente associado à estrutura do retículo endoplasmático liso (RACANIELLO, 2001).

O primeiro passo na replicação do RNA viral é copiar o RNA genômico para formar uma fita complementar de polaridade negativa, a qual servirá de molde para a síntese de novas fitas de polaridade positiva. A síntese da fita complementar é iniciada na extremidade 3'-NCR do genoma viral e utiliza a proteína VPg como um iniciador (“*primer*”). A partir de uma fita complementar de polaridade negativa, várias fitas nascentes de RNA com polaridade positiva são transcritas simultaneamente pela RNA polimerase viral, formando o chamado intermediário replicativo (RUECKERT, 1996; RACANIELLO, 2001).

Durante o início da replicação, parte do RNA positivo retorna ao citoplasma para a tradução de mais proteínas, enquanto outra parte permanece no retículo endoplasmático liso para a formação de mais centros de replicação de fita positiva. Posteriormente, as fitas positivas de RNA são acumuladas até serem empacotadas no interior dos capsídeos virais. As partículas completas são liberadas pela desintegração da célula hospedeira (WATSON, 1987; RUECKERT, 1996). A Figura 05 esquematiza todo o ciclo replicativo viral.

O tempo necessário para um ciclo de replicação completo, desde a infecção até a completa montagem do vírus, varia, geralmente, de 5 a 10 horas, dependendo de algumas variáveis, como: pH, temperatura, sorotipo do vírus, célula hospedeira, estado nutricional da célula e o número de partículas que a infectaram. Em condições ótimas, pode ocorrer a

biossíntese de 25.000 a 100.000 partículas virais por célula, mas somente 0,1% a 10% destas são infecciosas (MOORE & MORENS, 1984).

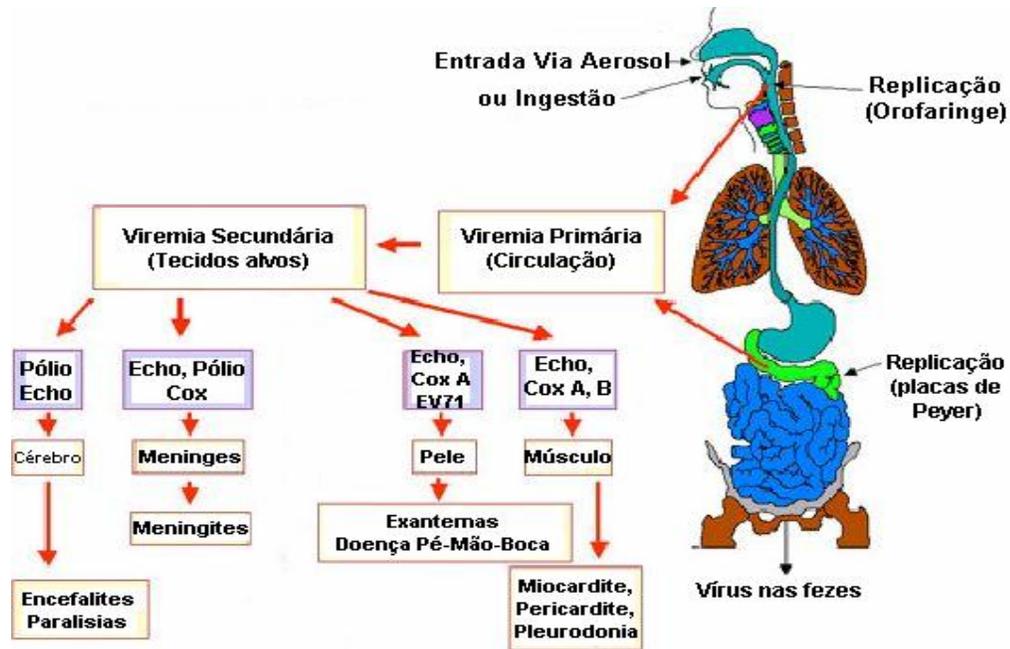


**Figura 05: Esquema demonstrando o ciclo de infecção dos picornavírus.** (1) adsorção das partículas virais a receptores na superfície celular e internalização; (2) liberação do RNA viral no citoplasma; (3) associação do RNA com ribossomos (a VPg é removida do RNA viral); (4) a poliproteína é clivada para dar origem a proteínas virais; (5) produção de fitas de RNA complementares com polaridade negativa contendo VPg no término 3'; (6) produção de fitas de RNA com polaridade positiva; (7) tradução de fitas de RNA com polaridade positiva para produzir proteínas adicionais; (8-9) as proteínas estruturais associam-se com moléculas de RNA com polaridade positiva que contêm VPg para a montagem das partículas virais; (10) clivagem de VP0 em VP4 e VP2; (11) liberação das partículas virais por lise celular. Adaptado de FIELDS et al, 1999 por COSTA, 1999.

## 1.6 PATOGENIA

O trato gastrointestinal e o trato respiratório superior, mais especificamente a orofaringe, são as principais portas de entrada para os enterovírus. Após sua entrada no hospedeiro, há uma replicação viral em alguns sítios de implantação (amídalas, linfonodos da orofaringe e intestino), podendo haver uma disseminação sistêmica, com a ocorrência de uma viremia transitória, que pode resultar na replicação viral em localizações secundárias como o

Sistema Nervoso, tanto o Central (SNC) como o Periférico (SNP) e o coração. Esta replicação, nestes sítios secundários, produz uma viremia secundária, onde o vírus pode ser detectado no sangue (Figura 06) (MOORE & MORENS, 1984).



**Figura 06: Patogenicidade dos enterovírus.** Adaptado de [www.med.sc.edu:85/virol/picorna.htm](http://www.med.sc.edu:85/virol/picorna.htm)

O período de incubação desses vírus pode levar, dependendo do sorotipo de enterovírus e do quadro clínico a ele associado, de 12 horas a 35 dias, podendo ocorrer neste período a replicação na faringe e a viremia. Uma semana após o início da doença uma pequena quantidade de vírus é encontrada na garganta e os enterovírus são eliminados nas fezes por até dois meses após a infecção, mesmo quando os anticorpos humorais já estão normalmente desenvolvidos durante o mesmo período (RACANIELLO, 2001).

O vírus, da corrente sanguínea, pode invadir o SNC a menos que um nível de anticorpos neutralizantes seja suficientemente alto para bloquear esse caminho. Durante a etapa neurológica, ocorre a proliferação intraneural dos vírus e o quadro clínico depende do número de neurônios motores agredidos. Os primeiros sinais de paresia surgem somente quando há destruição de cerca de 60% dos neurônios correspondentes a um determinado agrupamento muscular. A função desse agrupamento, permitindo a elevação contra a força de gravidade, é mantida apenas com 20% dos neurônios motores íntegros. A proliferação vital é inibida pela resposta imunológica do indivíduo infectado e alguns neurônios inicialmente agredidos podem recuperar paulatinamente suas funções, o que explicaria a regressão de

alguns paresias, observada na fase pós-febril imediata e até seis meses após a fase aguda (DIAMENT & KOK, 1991). Quando um indivíduo suscetível é exposto ao vírus, o mesmo se espalha ao longo das fibras nervosas, e no processo de multiplicação intracelular ele pode danificar ou destruir completamente a célula nervosa invadida, resultando em paralisia flácida (RACANIELLO, 2001). Os poliovírus apresentam elevada ubiquidade infectando 100% dos indivíduos suscetíveis que se encontram em seu raio de ação (DIAMENT & KOK, 1991). Quando um indivíduo suscetível é exposto a um poliovírus selvagem, a resposta poderá ser:

1) infecção inaparente (>90%–95% dos casos) - os vírus podem ser encontrados na garganta e/ou nas fezes, mas o paciente é assintomático;

2) “doença abortiva” (4%-8%) – também conhecida como “doença menor”, pode incluir febre, náuseas, vômitos e infecção respiratória semelhante à gripe, em várias combinações;

3) meningite asséptica ou poliomielite não-paralítica (1%-2%) – o paciente pode apresentar sinais prodrômicos compatíveis com a doença abortiva como descrito acima, seguido por invasão viral do SNC, causando doença similar à meningite asséptica e,

4) poliomielite paralítica (0,1%-2%) - A doença consiste normalmente de sintomas prodrômicos (semelhante à forma abortiva) que pode ser bifásica (especialmente em crianças), com irritação das meninges e eventual aparecimento de paralisia flácida assimétrica, envolvendo todos os músculos, ou paresias, envolvendo apenas alguns grupos musculares, devido ao dano espinhal e/ou bulbar causado pelo vírus (MOORE & MORENS, 1984; WHITE & FENNER, 1994).

## 1.7 PROFILAXIA

Poliovírus, agente causal da poliomielite, possui três sorotipos agrupados segundo a antigenicidade do capsídeo. Quando painéis de anticorpos monoclonais neutralizantes são utilizados, diferenças antigênicas são observadas entre as cepas dos três sorotipos. Entretanto, estas diferenças são invariavelmente confinadas aos limites de cada sorotipo, o que tem proporcionado uma profilaxia eficiente no controle da poliomielite, através da utilização de duas vacinas: a vacina de poliovírus inativada (IPV “*Inactivated Poliovirus Vaccine*”) desenvolvida por JONAS SALK e, a vacina de poliovírus oral (OPV “*Oral Poliovirus Vaccine*”) desenvolvida por ALBERT SABIN, ambas contendo os três sorotipos de poliovírus. A utilização da OPV nas campanhas de imunização em massa foi o principal fator no sucesso da erradicação de poliovírus selvagem nas Américas (DE-QUADROS et al, 1997).

Uma dose de OPV (0,5 ml administrada oralmente) contém, um mínimo de  $10^6$  DICT<sub>50</sub> (dose infectante em cultura de tecido) para cepa Sabin do poliovírus tipo 1 (P1/Sabin);  $10^{5.1}$  DICT<sub>50</sub> para a cepa Sabin do poliovírus tipo 2 (P2/Sabin) e  $10^{5.8}$  DICT<sub>50</sub> para a cepa Sabin tipo 3 (P3/Sabin), balanceada em uma formulação de 10:1:3, respectivamente. Cada dose de 0,5 ml também contém <25 µg de estreptomicina e neomicina (MMWR, 1997).

A OPV consiste de cepas Sabin obtidas a partir de amostras selvagens. Todos os três tipos P1/Sabin, P2/Sabin, e P3/Sabin que compõem a OPV foram derivados a partir de isolados selvagens por passagens seriadas em tecido de macacos *in vitro* e *in vivo* sobre uma variedade de condições, que diferem para cada uma das três cepas (ALMOND, 1987; RACANIELLO, 1988). Estas cepas perdem a sua neurovirulência, mas não a capacidade de se replicarem na garganta induzindo uma proteção específica contra uma infecção subsequente com poliovírus neurovirulentos (SABIN & BOULGER, 1973).

A OPV vem sendo amplamente usada por diversas razões: a) maior facilidade de administração (via oral); b) menor custo para aplicação; c) habilidade em induzir não apenas anticorpos séricos, mas também anticorpos secretores (IgA), e d) pela rapidez com que a vacina induz o aparecimento de imunidade duradoura (SABIN, 1985). A imunidade intestinal induzida pela OPV tem um importante papel na quebra da cadeia da circulação de poliovírus selvagens e limita e previne a re-infecção em humanos, prevenindo, deste modo, a transmissão natural de poliovírus (MELNICK, 1996). Estas propriedades tornaram a OPV a vacina de eleição para a iniciativa de erradicação da poliomielite (WRIGHT et al., 1991).

O Programa Nacional de Imunização (PNI) do Ministério da Saúde recomenda a administração de quatro doses da vacina atenuada, com início aos dois meses de idade, sendo as três primeiras doses aplicadas com intervalos de dois meses, com um reforço aos 15 meses; a quarta aos cinco anos de idade (WHO, 2003).

## 1.8 POLIOMIELITE PARALÍTICA ASSOCIADA À VACINA

A OPV é tida como uma das vacinas mais seguras atualmente em uso, entretanto, a seleção de variantes apresentando um aumento da neurovirulência constitui um problema real no tocante a segurança da vacina. Existe um pequeno, mas constante risco de casos de poliomielite associados ao uso da vacina (VAPP “*Vaccine Associated Paralytic Poliomyelitis*”) e outros efeitos adversos da vacina (FRIEDRICH, 1998).

Esta doença está mais freqüentemente associada com as cepas vacinais dos sorotipos 2 e 3 e raramente com o sorotipo 1 (NKOWANE et al., 1987). Dos 105 casos de VAPP que

ocorreram nos Estados Unidos em 1973 até 1984, 14 casos ocorreram em indivíduos imunocompetentes, 35 casos ocorreram em vacinados, 50 em pessoas que tiveram contato com os vacinados, e seis em pessoas com nenhum histórico aparente de vacinação ou exposição às vacinas (NKOWANE et al., 1987). O sorotipo P3/Sabin foi mais comumente encontrado tanto em vacinados quanto em comunicantes; P2/Sabin foi mais freqüente em comunicantes do que em vacinados, e P1/Sabin foi raramente implicado (ESTEVEES, 1988).

Em relação à classificação de casos associados à vacina, a Organização Pan Americana da Saúde considera como tal: doença parálitica aguda com isolamento do poliovírus vacinal em amostras de fezes (PAHO, 1994).

Existem dois tipos de casos de paralisia associado à vacina da poliomielite: no próprio vacinado ou no comunicante. Surge entre quatro a 40 dias depois da vacinação, no caso do próprio vacinado, e entre quatro e 85 dias no comunicante (MS, 2005).

A incidência encontrada de VAPP nos Estados Unidos foi de 1 caso/2,5 milhões de doses de OPV distribuídas (1980-1989) (WRIGHT et al., 1991), 1 caso/1,4 milhões de doses na Inglaterra e em Gales (1985-1991) e de 1 caso/1,5-2,2 milhões de doses na América Latina (1989-1991) (ANDRUS et al., 1995).

Estima-se que 250-550 casos de VAPP ocorram anualmente (WHO, 2003) numa proporção de 1 caso/1 milhão de doses de vacinas distribuídas (WOOD et al, 2000). No Brasil, a incidência de VAPP tem sido de 1 caso/4,4 a 6,7 milhões de doses administradas entre todos os vacinados (MS, 2005).

Mudanças fenotípicas devido à variabilidade das cepas Sabin são provavelmente uma das causas para a ocorrência de casos de VAPP. Durante a replicação das cepas vacinas em humanos, diferentes modificações genômicas, como mutações, deleções, inserções e recombinações têm sido observadas (MACADAM et al., 1989; DRIESEL et al., 1995; BELLMUNT et al., 1999; MULDER et al., 1999). Como as cepas derivadas da OPV são excretadas nas secreções nasofaríngeas e nas fezes após a vacinação, o vacinado torna-se uma fonte de disseminação de poliovírus, que pode ser transmitido para indivíduos susceptíveis e causar poliomielite (FRIEDRICH, 1998).

Com a erradicação dos poliovírus selvagens, tem-se sugerido que a transmissão potencial de poliovírus derivados de OPV poderia ter implicações para sua erradicação. Exemplos da circulação de cepas poliovírus derivados da vacina (VDPVs “*Vaccine Derived Poliovirus*”) tem recentemente sido descritos na Ilha de Hispanhola, Filipinas, Madagascar e Egito (KEW et al., 2004).

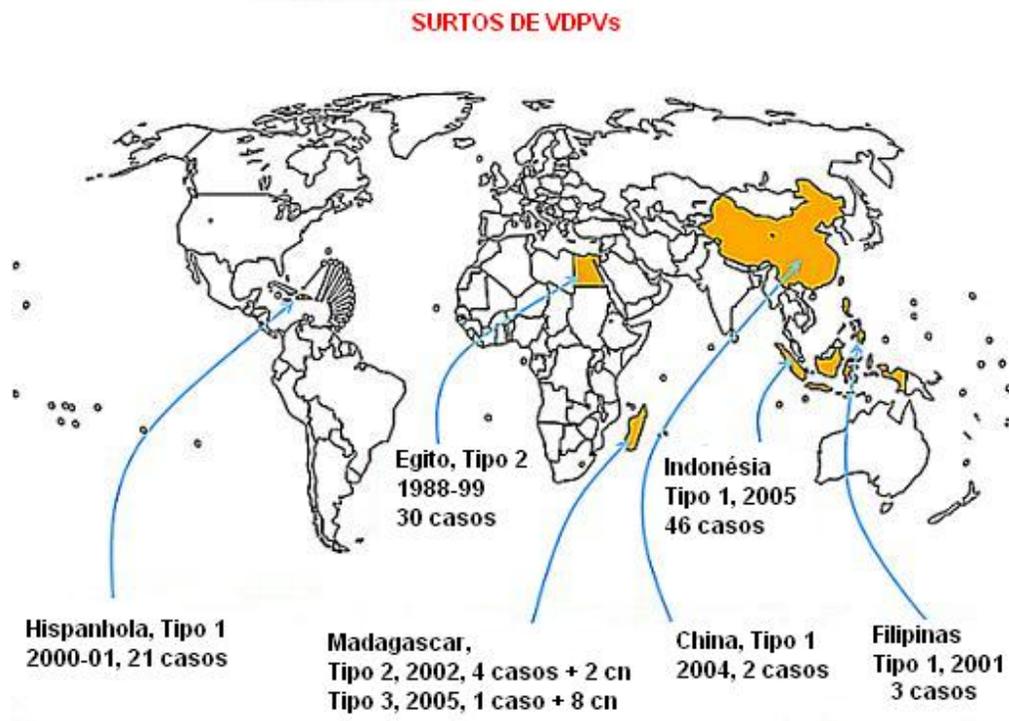
As mais importantes propriedades biológicas dos poliovírus derivado da vacina circulantes (cVDPVs) isolados são a sua elevada capacidade em causar a doença paralítica e a sua capacidade em manter a transmissão pessoa-pessoa. Quando testado experimentalmente, os isolados apresentaram-se neurovirulentos assim como os poliovírus selvagens para camundongos PVR-Tg. Assim como os poliovírus selvagens, os isolados cVDPV tem demonstrado a capacidade de se replicar em culturas de células sobre temperaturas supra-ótimas, apresentando altos títulos. Todos os isolados caracterizados apresentaram propriedades antigênicas mais relacionadas aquelas referentes aos poliovírus selvagens do que aquelas referentes às cepas Sabin originais (KEW et al., 2002; YANG et al., 2003).

Desde Janeiro de 2001, todos os poliovírus isolados são submetidos a dois métodos de diferenciação intratípica (ITD): um antigênico e um molecular. Os vírus classificados como “*non-Sabin-like*” são poliovírus selvagens, os “*Sabin-like*” são classificados como vírus vacinais, e qualquer resultado discordante ou isolados Sabin que falhem nos testes ITD são remetidos imediatamente para a análise genômica de VP1. Estes isolados são classificados segundo o resultado do seqüenciamento: a) vírus vacinal = <1% de diferença nucleotídica entre a amostra viral isolada e a seqüência do vírus Sabin padrão correspondente b) VDPV = 1%–15%, e c) vírus selvagem = >15%: (MMWR, 2002). A avaliação da divergência na seqüência do gene VP1 dos isolados Sabin pode ser utilizada como um “relógio molecular” para estimar a duração da replicação. A demarcação de 1% de diferença na seqüência nucleotídica de VP1 implica que a replicação do vírus vacinal tenha ocorrido por aproximadamente um ano (KEW et al., 2002).

Derivados da cepa OPV Sabin têm sido classificados em duas categorias: 1) Vírus OPV-*like* ou Sabin-*like*: a maioria dos isolados relacionados à vacina é classificada como “OPV-*like*” e apresentam um estreito relacionamento de seqüência (>99% de identidade de seqüência de VP1) com as cepas OPV originais (MMWR, 2004) e, 2) Poliovírus derivado da vacina: são definidos como vírus que apresentam ≤99% de identidade de seqüência de VP1 quando comparada a cepa Sabin parental e a extensão de suas mudanças genéticas é o indicativo de uma replicação prolongada (MMWR, 2004). Os VDPVs foram posteriormente categorizados em: 1) VDPVs circulantes (cVDPVs) quando existe a evidência de transmissão pessoa-pessoa, 2) VDPVs associados a imunodeficiência (iVDPVs) quando isolados em pessoas imunodeficientes (geralmente sem uma disseminação secundária), e 3) VDPVs ambíguos (aVDPVs) quando não existem evidências suficientes a respeito de circulação ou do

envolvimento de pacientes imunodeficientes, ou quando a origem do vírus não é específica de um paciente (como por exemplo, amostras isoladas do meio ambiente) (MMWR, 2005).

A circulação de VDPVs tem sido confirmada no Egito, Espanha, Filipinas e Madagascar (YANG et al., 2003; KEW et al., 2002; SHIMIZU et al., 2004, ROUSSET et al., 2003). Surtos causados pelo poliovírus do tipo 1 cVDPV foram detectados na China em 2004 (os isolados foram obtidos a partir de dois casos de paralisia flácida aguda (AFP “*Acute Flaccid Paralysis*”) e em três comunicantes na Província de Guizhou e na Indonésia em 2005 (12 casos). O poliovírus do tipo 2 VDPV foi isolado de casos únicos de AFP na República Democrática de Lao em 2004, em Hong Kong, na China e na Arábia Saudita em 2005. Surtos relacionados aos poliovírus tipo 2 e poliovírus tipo 3 VDPVs estão sendo investigados em Madagascar. O poliovírus tipo 3 VDPV foi confirmado em um caso de AFP e oito comunicantes em Madagascar em 2005. VDPVs isolados de fontes distintas de casos de AFP (aVDPVs) também têm sido descritos. Um poliovírus tipo 3 aVDPV foi isolado a partir de uma amostra de água de esgoto coletada na Estônia em 2003. O poliovírus tipo 2 aVDPV é o mais frequentemente detectado e tem sido isolado intermitentemente a partir de amostras de águas de esgoto coletadas na Eslováquia (entre outubro de 2003 a fevereiro de 2005), Egito (a partir de uma única amostra em 2005), e Israel (intermitentemente durante 2004-2005). Em 2003, o poliovírus tipo 1 VDPV foi isolado a partir de uma amostra isolada de uma criança saudável na Mongólia, e um poliovírus tipo 2 VDPV foi isolado de uma criança sadia em Latvia. Um poliovírus tipo 2 VDPV foi isolado de uma criança sadia no Japão em 2004. O poliovírus tipo 3 VDPV foi também isolado no Japão em 2005 de um adulto com paralisia flácida aguda e a partir de uma criança na mesma casa que tinha sido vacinada contra a poliomielite (Figura 07) (MMWR, 2004; MMWR, 2005).



**Figura 07: Surtos de pólio associados com a circulação de poliovírus derivado da vacina** ([http://www.polioeradication.org/content/fixe/opvcessation/opvc\\_vdpv.asp](http://www.polioeradication.org/content/fixe/opvcessation/opvc_vdpv.asp))

### 1.10 INSTABILIDADE DO GENOMA DOS POLIOVÍRUS

Mutações são freqüentes, porque os poliovírus, como outros vírus de RNA de fita simples e polaridade positiva, apresentam uma RNA-polimerase-RNA-dependente com elevado potencial de erro. A replicação viral é direcionada pelas RNA polimerases virais, de fidelidade relativamente baixa, com freqüência de erro característica de  $10^3$  a  $10^4$  nucleotídeos erroneamente incorporados por ciclo replicativo. Isso significa que a replicação dos poliovírus resulta em uma população de moléculas de RNA contendo, em média, pelo menos uma mutação. Enquanto algumas dessas mutações são deletérias ou afuncionais para os vírus e são eliminadas por seleção natural, outras são neutras e persistem na população viral, sendo descritas como *quasiespecies* (TAFSS et al., 1995).

A heterogeneidade e a plasticidade das populações virais têm imediata implicação nas vacinas de vírus atenuados. Tem sido demonstrado através de marcadores genéticos como *rct<sub>40</sub>* (“*Replicative Capacity at elevated Temperatures*”) e testes de neurovirulência em macacos MNVT (“*Monkey Neurovirulence Test*”), que a propagação de cepas Sabin, tanto *in*

*vitro* como *in vivo*, resulta em mudanças graduais em alguns marcadores de atenuação viral (BENYESH-MELNICK & MELNICK, 1959; SABIN, 1957, 1961).

Durante o processo de atenuação, os três sorotipos de poliovírus Sabin sofreram mutações pontuais (marcadores principais de neurovirulência), em uma localização similar, no sítio de entrada ribossomal interno IRES da região 5'-NCR do genoma, na região do domínio V (WIMMER, 1997). Os pontos de mutação atenuantes nas IRES das amostras Sabin são os nucleotídeos 480 em P1/Sabin (KAWAMURA et al., 1989), 481 em P2/Sabin (MACADAM et al., 1991a), e 472 em P3/Sabin (EVANS et al., 1985). Estas mutações desestabilizam a estrutura secundária do RNA (MACADAM et al., 1992). Acredita-se que essa desestabilização perturbe a ligação de fatores celulares neurais específicos para o sítio de entrada ribossomal interno no RNA viral genômico, havendo iniciação da tradução do genoma viral de forma insuficiente, com um decréscimo da replicação viral nos neurônios (induzindo a um fenótipo atenuado) (PALLANSH & ROSS, 2001).

Em outras palavras, esses fatores, nos neurônios, ligam-se a um sítio de entrada ribossomal da amostra Sabin mutante bem menos eficientemente do que no sítio de entrada ribossomal da amostra selvagem e, portanto, a tradução do RNA da amostra vacinal é reduzida nos neurônios, e conseqüentemente a replicação viral nestes é atenuada (PALLANSH & ROSS, 2001).

A comparação da seqüência nucleotídica entre as cepas Sabin atenuadas, cepas vacinais revertentes neurovirulentas e cepas precursoras neurovirulentas das cepas vacinais, têm permitido identificar diferenças nucleotídicas entre elas, e possíveis mutações envolvidas na atenuação e na reversão à neurovirulência (ALMOND, 1987; RACANIELLO, 1988; FRIEDRICH, 1992, 1993).

Os poliovírus podem ser recuperados de cópias de cDNA do genoma clonado (RACANIELLO; BALTIMORE, 1981a; RACANIELLO, 1993). Esta técnica tem permitido a construção de recombinantes entre cepas atenuadas e neurovirulentas, e o uso de mutagênese sítio-dirigida, na identificação de mutações envolvidas na atenuação e na reversão à neurovirulência (MINOR, 1992, 1993; MINOR et al., 1993). A utilização desta técnica permitiu que determinantes significantes de atenuação fossem encontrados nas regiões 5'-NCR e na no gene VP1 das cepas Sabin.

### 1.10.1 Bases moleculares da atenuação e da reversão à neurovirulência da cepa vacinal P1/Sabin

A cepa atenuada P1/Sabin (P1/LSc,2ab) foi derivada de uma cepa neurovirulenta selvagem denominada P1/Mahoney/41, isolada de fezes de uma criança saudável (ALMOND, 1987; RACANIELLO, 1988). A comparação da seqüência nucleotídica completa da cepa P1/Sabin (NOMOTO et al., 1982; TOYODA et al., 1984) com a seqüência da sua cepa precursora P1/Mahoney/41 (KITAMURA et al., 1981; RACANIELLO & BALTIMORE, 1981b) demonstrou mais de 56 diferenças nucleotídicas, sendo que 21 destas eram também deram origem a trocas de aminoácidos entre as duas cepas, as quais ocorreram durante o processo de atenuação. Testes de neurovirulência em macacos utilizando recombinantes inter e intratípicos construídos entre a cepa P1/Sabin e a cepa P1/Mahoney demonstraram que as mutações envolvidas na atenuação da cepa P1/Sabin estão espalhadas por todo o genoma viral (OMATA et al., 1986). A principal mutação atenuante foi identificada como A<sub>480</sub>→G na região 5'-NCR (KAWAMURA et al., 1989).

Experimentos com poliovírus recombinantes intratípicos sugeriram que os principais determinantes genômicos que limitam a multiplicação da cepa atenuada P1/Sabin em células de neuroblastoma humano estão localizados na metade 5' do genoma viral, embora a metade 3' também parece contribuir de algum modo para este fenótipo (AGOL et al., 1989).

A análise de poliovírus revertentes neurovirulentos derivados de P1/Sabin, selecionados em altas temperaturas, demonstrou que uma mutação na região 5'-NCR, U<sub>525</sub>→C (nesta posição, os genomas de P1/Mahoney e P1/Sabin são idênticos apresentando U<sub>525</sub>), uma mutação C<sub>6203</sub>→U na região codificante do gene da 3D<sup>pol</sup> (levando a alteração de His<sub>73</sub>→Tyr na RNA polimerase viral) e uma mutação G<sub>7441</sub>→A na região 3'-NCR (último nucleotídeo antes da seqüência poli-A do genoma de P1) são importantes para a reversão da cepa P1/Sabin à neurovirulência em macacos (CHRISTODOULOU et al., 1990).

A participação da mutação no nucleotídeo 480 também foi sugerida pela observação de que U<sub>525</sub>→C em combinação com G<sub>7441</sub>→A aumentou a neurovirulência de P1/Sabin, onde o grau no marcador de lesões histológicas em primatas foi aproximadamente à metade daquela estipulada para P1/Mahoney (CHRISTODOULOU et al., 1990).

Lotes vacinais da cepa P1/Sabin com uma quantidade aumentada de revertentes de G<sub>480</sub>→A e U<sub>525</sub>→C apresentaram um elevado aumento da neurovirulência em testes em macacos realizados para avaliar a segurança de lotes vacinais (REZAPKIN et al., 1994; 1998).

Outra observação feita sugere que a mutação C<sub>6203</sub>→U, quando associada com as mutações U<sub>525</sub>→C e G<sub>7441</sub>→A, confere ao vírus um fenótipo completamente virulento. Este estudo ainda sugeriu que a mutação U<sub>525</sub>→C suprime o efeito atenuante da base G no nucleotídeo 480, e que mutações A<sub>2438</sub>→C, levando a substituição Met<sub>225</sub>→Leu de VP3, G<sub>2741</sub>→U, levando a substituição de Ala<sub>88</sub>→Ser de VP1, e A<sub>2795</sub>→G, levando a substituição Thr<sub>106</sub>→Ala de VP1, também poderiam ter um efeito na reversão à neurovirulência (CHRISTODOULOU et al., 1990).

Testes de neurovirulência de recombinantes construídos entre a cepas P1/Sabin e a cepa P1/Mahoney, em camundongos PVR-Tg, sugeriram uma contribuição importante do nucleotídeo 480 para a expressão do fenótipo neurovirulento ou atenuado (HORIE et al., 1994). Este estudo sugeriu a participação de uma mutação de G<sub>935</sub>→U de VP4 para a atenuação da cepa P1/Sabin. Outros testes de neurovirulência de recombinantes entre as cepas P1/Sabin e P1/Mahoney e de mutantes sítios-dirigidos, em camundongos PVR-Tg, identificaram mutações atenuantes adicionais àquela encontrada no nucleotídeo 935, 2438-VP3, 2795-VP1 e 2879-VP1. A mutação atenuante G<sub>945</sub>→U leva a substituição Ala<sub>65</sub>→Ser de VP4; a mutação U<sub>2438</sub>→A leva a substituição de Leu<sub>225</sub>→Met de VP3; a mutação G<sub>2797</sub>→A leva à substituição de Ala<sub>106</sub>→Thr de VP1; a mutação C<sub>2879</sub>→U leva a substituição de Leu<sub>134</sub>→Phe de VP1 (BOUCHARD; LAM; RACANIELLO, 1995).

O uso de quimeras entre P1/Sabin e P2/Sabin adaptadas a camundongos (cepa v510) sugere fortemente que a substituição U<sub>6203</sub>→C (Tyr<sub>73</sub>→His), na região da polimerase viral 3D<sup>pol</sup> é um determinante atenuante da cepa P1/Sabin. A análise dos valores dos testes de neurovirulência em camundongos demonstrou que tanto C<sub>6203</sub> e G<sub>480</sub> atuam independentemente para atenuar o poliovírus tipo 1. Além disto, este estudo demonstrou que quando o genoma viral apresentava estas duas mutações, e ambas eram expressas, elas apresentam um efeito acumulativo na atenuação, preferencialmente, do que um efeito sinérgico. A mutação C<sub>6203</sub> atua como a principal contribuição para o fenótipo temperatura sensível, entretanto, a introdução de apenas uma mutação C<sub>6203</sub> no gene 3D<sup>pol</sup> em dois mutantes analisados, não resultou em aumento da termosensibilidade, sugerindo que a mutação C<sub>6203</sub> está fenotipicamente associada à pelo menos uma das 11 mutações localizadas na região 3' terminal do genoma de P1/Sabin (3D<sup>pol</sup>/3'-NCR) (TARDY-PANIT et al, 1993).

O efeito termo-sensível associado à região 3' terminal do genoma P1/Sabin é resultado de um efeito acumulativo e/ou sinérgico de pelo menos três determinantes, incluindo, em adição o códon His<sub>73</sub>, o Ile<sub>362</sub> (U<sub>7071</sub>) de 3D<sup>pol</sup> e os nucleotídeos G<sub>7441</sub> e C<sub>7410</sub> na região 3'-NCR. Dos três resíduos de P1/Sabin, Asn<sub>53</sub> (A<sub>6143</sub>), His<sub>73</sub>, e Ile<sub>362</sub>, resultantes de mutações não-silenciosas em 3D<sup>pol</sup>, somente His<sub>73</sub>, e Ile<sub>362</sub> parecem afetar as funções virais em altas

temperaturas e, estão envolvidos, independentemente, na sensibilidade à temperatura, apesar de apresentarem um efeito mais potencializado quando expressas juntamente, podendo afetar outras funções virais. O resíduo His<sub>73</sub> reduz a iniciação da síntese de RNA viral acima de 38°C enquanto Ile<sub>362</sub> parece afetar a atividade da polimerase 3D<sup>pol</sup>, uma vez que este resíduo localiza-se perto do domínio D (aminoácidos 351-361), um domínio comum para várias RNA polimerases. Resultados sugerem que G<sub>7441</sub> sozinha ou em associação com C<sub>7410</sub> está envolvida no fenótipo termo-sensível de P1/Sabin, enquanto, C<sub>7410</sub> não contribui para o efeito (GEORGESCU et al., 1995a). A mutação na posição 7441 parece estar envolvida na iniciação da síntese da fita negativa de RNA (BORZAKIAN et al., 1993).

Testes de neurovirulência utilizando mutagênese sítio-dirigida para gerar mutantes P1/Sabin/P1/Mahoney com mudanças nucleotídicas nestas posições, seguidos por testes de neurovirulência em macacos demonstraram que em contraste com estudos anteriores a mutação G<sub>480</sub> de P1/Sabin para A<sub>480</sub> em P1/Mahoney resulta somente em um pequeno aumento na virulência. Além disto, a mutação 6203 nesta cepa teve um pequeno efeito adicional no nível de neurovirulência. Portanto, estes estudos moleculares têm sugerido que uma mutação A<sub>480</sub>→G da região 5'-NCR da cepa P1/Sabin tem uma contribuição importante na atenuação, enquanto uma mutação de U<sub>6203</sub>→C, resultando na substituição de um aminoácido na RNA polimerase viral, também tem sido sugerida como um determinante de atenuação, embora em um grau menor. Em contraste com os estudos anteriores, este estudo indicou que G<sub>480</sub> possui apenas um efeito atenuante menor do que o da posição anterior. Estes resultados confirmam a existência de outros determinantes atenuantes espalhados ao longo do genoma da cepa P1/Sabin (McGOLDRICK et al., 1995). Interessantemente, ambas as mutações G<sub>480</sub> e C<sub>6203</sub> juntas em P1/Mahoney são selecionadas *in vitro* (FURIONE et al., 1993; OTELEA et al., 1993). Entretanto, estas reversões não foram correlacionadas com o aumento da neurovirulência em lotes de vacinas (REZAPKIN et al., 1994).

Os nucleotídeos 480 e 525 apresentam um pareamento de bases na raiz da estrutura em *loop* do domínio F da região 5'-NCR (SKINNER et al., 1989), domínio este que faz parte da IRES (MUZYCHENKO et al., 1991). É um pareamento de bases não contínuas que ocorre na estrutura secundária da região 5'-NCR (PILIPENKO et al., 1989; MUZYCHENKO et al., 1991; HELLEN et al., 1995). Tem sido sugerido que G<sub>480</sub> de P1/Sabin resulta na alteração de um par de bases A<sub>480:525</sub>→U encontrado na cepa P1/Mahoney para um par de bases G<sub>480:525</sub>→U encontrado na cepa P1/Sabin, sugerindo que o fenótipo atenuado está parcialmente associado ao enfraquecimento do pareamento das bases em uma estrutura altamente conservada (CHRISTODOULOU et al., 1990; MUZYCHENKO et al., 1991; AGOL, 1991; MINOR, 1992; MACADAM et al., 1994). A alteração da estrutura secundária

da região 5'-NCR, causada por G<sub>480</sub>, poderia alterar a interação do RNA viral com um ou mais fatores do hospedeiro necessários para a iniciação da tradução, levando a uma diminuição do nível da tradução, replicação e neurovirulência viral (SVITKIN; MASLOVA; AGOL, 1985, 1988; KAWAMURA et al., 1989; AGOL, 1991; MUZYCHENKO et al., 1991). A presença de uma mutação revertente G<sub>480</sub>→A ou uma mutação supressora U<sub>525</sub>→C revertem esse processo (CHRISTODOULOU et al., 1990; MUZYCHENKO et al., 1991). Por outro lado, o forte pareamento das bases e a atividade *in vitro* do RNAm viral poderiam ser restaurados tanto por uma reversão direta A<sub>480</sub> ou por uma mutação C<sub>525</sub> (MUZYCHENKO et al., 1991).

Outros estudos sugerem que a mutação atenuante de U<sub>6203</sub>→C, levando a substituição de Tyr<sub>73</sub>→His da RNA polimerase viral, esteja envolvida na termo-sensibilidade da cepa vacinal e diminua a eficiência da síntese do RNA viral (CHRISTODOULOU et al., 1990; TARDY-PANIT et al., 1993).

A mutação G<sub>7441</sub> da região 3'-NCR poderia alterar a estrutura secundária e/ou afinidade com o fator do hospedeiro pelo RNA viral, inibindo a replicação (CHRISTODOULOU et al., 1990).

A extensiva pesquisa de passagens em culturas de células para todos os três tipos de poliovírus atenuados detectou um relativo número de mutações que consistentemente acumulam-se durante as condições de cultivo *in vitro* com um perfil específico para cada substrato e para as condições utilizadas na propagação viral (REZAPKIN et al., 1994, 1995; TAFFS et al., 1995).

Mutantes consistentemente acumulando-se durante passagens seriadas *in vitro* foram identificadas através do teste molecular MAPREC (“*Mutant Analysis by Polymerase chain Reaction and Enzyme Cleavage*”).

Estas mutações foram observadas na região não codificante (480, 525 e 7441) e nas regiões codificantes, (1449, 4994 e 6203) e 1123 e 1141 (mutações silenciosas). Mutações não silenciosas G<sub>1449</sub>→A e G<sub>4994</sub>→A induzem uma Gln<sub>166</sub>→Arg de VP2 e no aminoácido 238 de 2C, respectivamente (REZAPKIN et al., 1994). O papel destas mutações é desconhecido, mas vale a pena lembrar que VP2 localiza-se na superfície da partícula viral, estando envolvida na neutralização dos poliovírus com anticorpos neutralizantes (PAGE et al., 1988) e que na região 2C encontra-se a região conhecida por apresentar a propriedade guanidina-resistente do vírus, além de estar envolvida de algum modo na replicação do RNA (LI & BALTIMORE, 1988).

REZAPKIN e colaboradores (1994) observaram o acúmulo de mutações que consistentemente são inseridas no genoma de P1/Sabin. O vírus vacinal foi passado 10 vezes

em dois cultivos celulares, AGMK e Vero, ambas em temperatura ótima e supra-ótima (34°C e 37°C) com o objetivo de amplificar consistentemente mutações selecionadas para um nível detectável. Em células AGMK o nível de acumulação foi mais lento, e ambas as mutações foram se acumulando gradualmente, com A<sub>480</sub> mais rápido que C<sub>525</sub>. Quando P1/Sabin foi propagado em cultura de células Vero, o pareamento A:U foi mais rapidamente selecionado ao invés de G:C em cultura confluenta, demonstrando que o “*status*” do substrato celular pode afetar não somente o nível de acumulação, mas também o tipo de reversão. A mutação mais proeminente selecionada foi o pareamento complementar 480-525, trocando G:U no domínio F da região 5'-NCR tanto para A:U ou G:C. A quantificação simultânea de mutações nos nucleotídeos 480 e 525 demonstrou que estes revertentes nunca ocorrem simultaneamente, sugerindo que a configuração instável A:C possa ser letal para o vírus. Em contraste, a substituição do fraco pareamento G:U presente na cepa P1/Sabin tanto por A:U ou por G:C aumenta a adaptação do vírus tanto em culturas de células quanto no SNC de macacos, resultando na perda da atenuação (REZAPKIN et al., 1994).

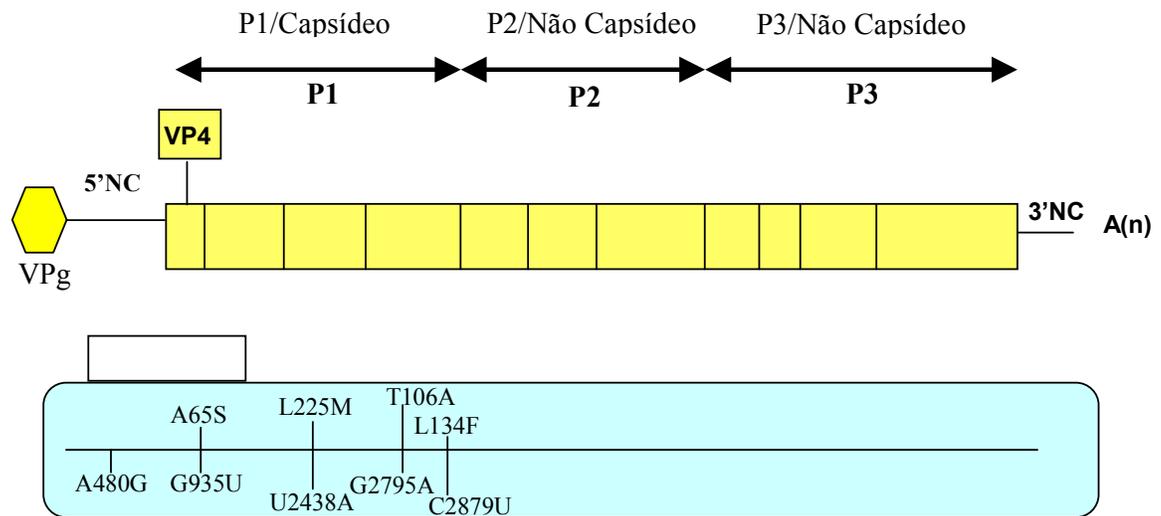
Para identificar outras mutações no genoma viral adquiridas durante a replicação no SNC de primatas não humanos, isolados foram pesquisados através da técnica de SHA (“*Sequency Heterogeneity Assay*”). Todas as mutações encontradas foram localizadas na região não codificante: 480, 525, U<sub>612</sub>→C, G<sub>2741</sub>→A, Ala<sub>88</sub>→Thr de VP1e o pares de bases GU-AU ou GU-GC formado pelos nucleotídeos U<sub>7427/7441</sub>→C (REZAPKIN et al., 1994). O nucleotídeo U<sub>612</sub> é complementar a base A do códon AUG dentro do elemento B-*box*, um componente essencial a IRES dos poliovírus (PILIPENKO et al., 1992). Isto sugere que U<sub>612</sub>→C pode influenciar a iniciação da síntese proteica (LU et al., 1996). A alteração A<sub>2741</sub> é um determinante de termo-sensibilidade do vírus, sendo selecionado em culturas de células a 38,5 °C, mas não em 37 °C (LU et al., 1996). A mutação U<sub>7427</sub>→C é complementar ao nucleotídeo 7441 (PILIPENKO et al., 1992), e provavelmente estabiliza o “*hairpin*” do RNA viral. Esta mutação C<sub>7427</sub> foi sempre encontrada na mesma molécula RNA que continha A<sub>480</sub> enquanto a sua frequência diminui em culturas devido à competição com vírus contendo C<sub>525</sub> (LU et al, 1996).

A construção e caracterização de mutantes P1/Sabin determinaram uma reversão no nucleotídeo 189 da região 5'-NCR que parece apresentar um papel no aumento da neurovirulência e na perda da sensibilidade da temperatura. Entretanto, o efeito de U<sub>189</sub> depende da presença de outros determinantes (GEORGESCU et al., 1997).

Em um estudo envolvendo o seqüenciamento nucleotídeo parcial de cepas derivadas da cepa P1/Sabin isoladas de cinco casos VAPP, foi demonstrado G<sub>480</sub>→A em todas as cepas (OTELEA et al., 1993). Em um outro estudo, cepas de poliovírus derivadas da cepa P1/Sabin

isoladas de fezes de quatro casos de VAPP, também apresentaram G<sub>480</sub>→A em três cepas e U<sub>525</sub>→C em outra cepa (LI et al., 1996).

As mutações nos nucleotídeos 480 e 525 também foram observadas em poliovírus derivados da cepa P1/Sabin após multiplicação no intestino de indivíduos vacinados saudáveis (MINOR & DUNN, 1988; DUNN et al., 1990; GUILLOT et al., 1994). A Figura 08 demonstra a localização dos principais nucleotídeos atenuantes na cepa Sabin 1.



**Figura 08: Localização dos principais nucleotídeos atenuantes (barras inferiores) e substituições de aminoácidos (barras superiores) na cepa Sabin 1.** Abreviação dos resíduos de nucleotídeos: A, adenina; C, citosina; G, guanina; U, uracila. Abreviação dos resíduos de aminoácidos: A, alanina; F, fenilalanina; H, histidinina; L, leucina; M, metionina; S, serina; T, treonina; Y, tirosine. Adaptado de KEW et al., 2005.

#### 1.10.1.1 Modificações genômicas em poliovírus tipo 1 isolados de casos de poliomielite associados à vacina e de indivíduos vacinados saudáveis

Em um estudo envolvendo o seqüenciamento parcial de cepas P1/Sabin derivadas de isoladas de cinco casos VAPP (quatro de fezes e uma de SNC), foi demonstrado uma mutação revertente G<sub>480</sub>→A em todas as cepas (OTELEA et al., 1993; GUILLOT et al., 1994). Em uma destas cepas, isolada de fezes, foram observadas outras mutações revertentes nos nucleotídeos 2749-VP1, 6141 e 6203 (3D<sup>pol</sup>), 7441 (3'-NCR), e também outras mutações novas (OTELEA et al., 1993). Em um outro estudo, cepas de poliovírus derivados da cepa P1/Sabin isoladas de quatro casos VAPP, também apresentaram várias mutações, entre as quais uma mutação G<sub>480</sub>→A em três cepas e uma mutação U<sub>525</sub>→C em outra cepa (LI et al., 1996). Duas destas cepas também apresentaram um genoma recombinante com substituição

de C<sub>6203</sub>→U, levando a mudança de His<sub>73</sub>→Tyr da RNA polimerase viral (LI et al., 1996). Como todas as cepas derivadas de P1/Sabin isoladas de casos VAPP (oito das fezes e uma do SNC), e citadas acima, mutaram no nucleotídeo 480 (ou 525) (OTELEA et al., 1993; LI et al., 1996), é interessante observar que uma cepa derivada da cepa P1/Sabin sem mutações nos nucleotídeos 480 e 525, e também sem mutações nos nucleotídeos 476 (CONTRERAS et al., 1992), 2741, 2795, 6203 e 7441, foi isolada do SNC de um caso de poliomielite associado à vacina (GEORGESCU et al., 1994), sugerindo que estas mutações podem não ser essenciais ao estabelecimento da doença.

Das dez cepas de poliovírus derivadas da cepa P1/Sabin isoladas de casos VAPP (OTELEA et al., 1993; GEORGESCU et al., 1994; LI et al., 1996), apenas duas demonstraram ser recombinantes possuindo parte do genoma derivado, provavelmente, de cepas selvagens (LI et al., 1996). O isolamento de poliovírus recombinantes em casos de VAPP sugeriu que a recombinação também pode contribuir para o aumento da neurovirulência. A análise de poliovírus isolados em casos de VAPP demonstrou que existe uma seleção durante a replicação da cepa P1/Sabin *in vitro* contra His<sub>73</sub> (C<sub>6203</sub>), Ile<sub>362</sub> (U<sub>7071</sub>) de 3D<sup>pol</sup>, e contra G<sub>7441</sub> da região 3'-NCR. Entretanto, U<sub>7071</sub> (Ile<sub>362</sub>) pareceu ser mais estável do que (C<sub>6203</sub>) His<sub>73</sub> e G<sub>7441</sub>. Todos os isolados recombinantes analisados apresentaram a mutação revertente C<sub>6203</sub>→U (3D<sup>pol</sup>) (GEORGESCU; DELPEYROUX; CRANIC, 1995). Outras mutações, adicionais a G<sub>480</sub>→A também foram encontradas no genoma de poliovírus recombinantes, nos códons 189 (5'-NCR), 65-VP4, 60-VP3, 59-60-VP3, 90-VP1, 106-VP1, 222-VP1, 36-2A, 134-2A, 1885, 3052, 3073, 3991 e U<sub>5350</sub> (região 3C) isolados de casos de VAPP (GEORGESCU et al., 1997).

As mutações nos nucleotídeos 480 e 525 também foram observadas em poliovírus derivados da cepa P1/Sabin após replicação no intestino de indivíduos vacinados saudáveis (MINOR & DUNN, 1988; DUNN et al., 1990; MUZYCHENKO et al., 1991; GUILLOT et al., 1994). Embora em outro estudo a mutação revertente G<sub>480</sub>→A não tenha sido observada em poliovírus derivados da cepa P1/Sabin, após passagens no trato intestinal de indivíduos saudáveis, uma mutação de U<sub>476</sub>→A foi observada, e também foi sugerido que esta mutação poderia ter algum papel na reversão a neurovirulência (CONTRERAS et al., 1992). A mutação nesta posição converte um par de bases não pareado U-U nos nucleotídeos 476-528 em um par A-U em uma estrutura secundária da região 5'-NCR.

No Brasil, oito amostras P1/Sabin derivadas isoladas de casos de paralisia foram parcialmente seqüenciadas com o objetivo de investigar as mutações revertentes nas posições 480, 525 e 6203 do genoma. Quatro amostras apresentaram G<sub>480</sub>→A, seis amostras apresentaram U<sub>525</sub>→C e sete amostras apresentaram C<sub>6203</sub>→U levando a substituição de

His<sub>73</sub>→Tyr da RNA polimerase. Uma amostra apresentou G<sub>480</sub>, A<sub>480</sub> e C<sub>525</sub>, U<sub>525</sub>, e manteve C<sub>6203</sub>, indicando que pelo menos duas populações se encontravam presentes (FRIEDRICH et al., 1995).

#### 1.10.2 Bases moleculares da atenuação e da reversão à neurovirulência da cepa vacinal P2/Sabin

A cepa atenuada P2/Sabin (P2/P712,Ch,2ab) foi derivada de uma cepa selvagem com baixa neurovirulência, denominada P2/P712/56, isolada de fezes de uma criança saudável (RACANIELLO, 1988).

A análise da seqüência nucleotídica da cepa P2/Sabin revelou que ela difere de uma cepa revertente neurovirulenta, P2/117 em 23 nucleotídeos. Destas 23 mutações verificadas, três foram encontradas na região 5'-NCR do genoma. As 20 mutações restantes ocorrem na região codificante gerando cinco mudanças de aminoácidos, uma mutação em cada proteína de capsídeo VP4 e VP1, uma na proteína não estrutural 2B, e duas mutações na 3D<sup>pol</sup> (POLLARD et al., 1989).

A comparação da seqüência nucleotídica parcial da região 5'-NCR da cepa precursora da cepa P2/Sabin demonstrou a presença de C<sub>398</sub> e de G<sub>481</sub> (MUZYCHENKO et al., 1991).

A cepa vacinal P2/Sabin possui A<sub>481</sub>, enquanto P2/117 apresenta uma base G nesta posição (POLLARD et al., 1989). A transição da posição 481 parece ser acompanhada por uma segunda mutação na posição 398; onde aqui, a base U da cepa P2/Sabin é normalmente substituída por uma base C. A mesma combinação de C<sub>398</sub> e G<sub>481</sub> parece como uma característica do precursor da cepa P2/Sabin, P/712 (MUZYCHENKO et al., 1991).

Diferentemente do pareamento de bases entre os nucleotídeos 480 e 525 no genoma P1/Sabin, o pareamento entre os nucleotídeos 398 e 481 em P2/Sabin não é previsto pela existência de uma estrutura secundária na região 5'-NCR (RIVERA; WELSH; MAIZEL, 1988; PILIPENKO et al., 1989; SKINNER et al., 1989, MACADAM et al., 1991a, 1992), mas sim pelo envolvimento de interações terciárias (PILIPENKO et al., 1989). Esta desestabilização da estrutura secundária (e/ou terciária da região 5'-NCR) da cepa P2/Sabin altera a sua interação com um ou mais fatores do hospedeiro necessários para a iniciação da tradução, resultando em uma tradução ineficiente do RNA viral, a qual diminuiria parcialmente a replicação e neurovirulência viral (MUZYCHENKO et al., 1991; AGOL, 1991; MACADAM et al., 1991a, 1994). O pareamento das bases 398-481 confere vantagens para o crescimento viral em certas linhagens celulares diferenciadas. A mutação G<sub>481</sub>→A

diminui a eficiência da iniciação da poliproteína (MUZECHENKO et al., 1991), devido à deficiência do RNA em direcionar a síntese de proteínas virais específicas (SVITKIN; MASLOVA; AGOL, 1985; SVITKIN et al., 1988; 1990). O papel da mutação U<sub>398</sub>→C parece ser menos significativo na eficiência da tradução (MUZYCHENKO et al., 1991). Todos os derivados de P2/Sabin isolados de casos de VAPP com aumento da neurovirulência demonstraram reversão de G<sub>481</sub>, e a maioria deles também apresentava C<sub>480</sub> (MUZYCHENKO et al., 1991).

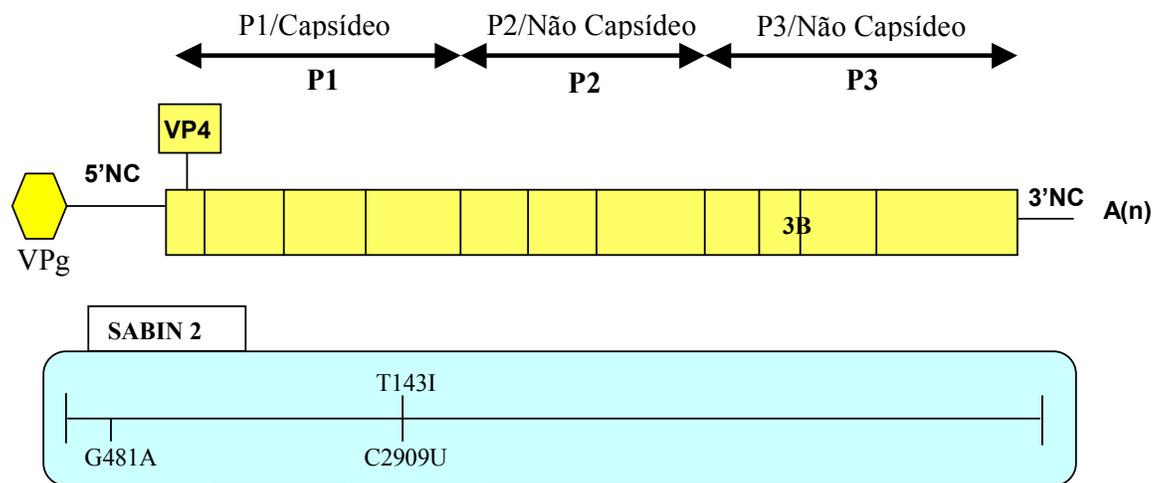
A construção de recombinantes entre a cepa atenuada P2/712 e a cepa neurovirulenta adaptada a camundongos P2/Lasing e o uso de mutagênese sítio-dirigida foi utilizado para identificar regiões do genoma de P2/Sabin que atenua a virulência de P2/Lasing em camundongos (REN; MOSS; RACANIELLO, 1991). Estes estudos demonstraram que A<sub>481</sub> da região 5'-NCR e A<sub>2980</sub> do aminoácido 143-VP1 (Ile→Val ou Ile→Thr) são os principais determinantes atenuantes no genoma de P2/712 em camundongos normais e em camundongos PVR-Tg (MOSS; O'NEIL; RACANIELLO, 1989; REN; MOSS; RACANIELLO, 1991).

Recombinantes entre a cepa atenuada P2/Sabin e a cepa revertente neurovirulenta P2/117, isolada de um caso de VAPP, juntamente com o uso de mutagênese sítio-dirigida, demonstrou que A<sub>481</sub> da região 5'-NCR e Ile<sub>143</sub> de VP1, também são importantes determinantes da atenuação da cepa P2/Sabin em primatas. Mutações em apenas estes dois determinantes atenuantes resultaram em um vírus altamente neurovirulento (MACADAM et al., 1993). Embora mutações revertentes nestes dois determinantes atenuantes sejam importantes para a reversão à neurovirulência da cepa P2/Sabin, mutações nos nucleotídeos U<sub>398</sub>, U<sub>437</sub> e A<sub>685</sub> (5'-NCR) e U<sub>836</sub> induzindo Ala<sub>41</sub>→Ser de VP4 da cepa P2/Sabin também estão envolvidas na atenuação e na reversão desta cepa a neurovirulência (REN; MOSS; RACANIELLO, 1991; MACADAM et al., 1991a; 1993).

Revertentes P2/Sabin neurovirulentos sempre perdem Ile<sub>143</sub> de VP1, por Val, Thr, Ser, Asn resultante a partir de mutações nos nucleotídeos 2908 e 2909. Os resíduos de Val e Thr, pelo menos, resultam na perda da atenuação tanto em macacos como em camundongos PVR-Tg (MACADAM et al., 1991a; REN; MOSS; RACANIELLO, 1991).

Ficou demonstrado que a cepa P2/Sabin é geneticamente estável sob as condições utilizadas na produção da vacina, mas a neurovirulência aumenta significativamente quando o vírus é submetido a condições anormais de cultivo. O genoma de P2/Sabin propagado acima de cinco passagens em cultura de células AGMK a 34°C e 37°C apresentou duas e três mutações respectivamente, e para vírus propagado em células Vero, nas mesmas temperaturas, três e 11 mutações foram encontradas respectivamente (TAFFS et al., 1995).

Todos os trabalhos supracitados revelam que a reversão  $A_{481} \rightarrow G$  da região 5'-NCR é um importante determinante no teste de neurovirulência em macacos. Entretanto, análises de lotes vacinais onde o vírus foi propagado seriadamente por seis vezes com o intuito de se obter uma maior quantidade de mutações, demonstrou que o nível de neurovirulência foi baixo, concluindo que a presença apenas de  $G_{481}$  não aumenta a neurovirulência do poliovírus tipo 2 em macacos. O papel desta mutação foi verificado utilizando-se uma cepa P2 usada na produção de OPV na China, Chung 2. Esta cepa foi derivada por passagem seriada sob condições de baixa temperatura e multiplicidade. A seqüência nucleotídica de Chung 2 revelou que ela difere de P2/Sabin em 52 sítios. Chung 2 apresenta 100% do tipo selvagem  $G_{481}$ , mas possui grau de neurovirulência extremamente baixo em macacos Rhesus (REZAPKIN et al, 1999). A Figura 09 demonstra a localização dos principais nucleotídeos atenuantes na cepa Sabin 2.



**Figura 09: Localização dos principais nucleotídeos atenuantes (barras inferiores) e substituições de aminoácidos (barras superiores) na cepa Sabin 2.** Abreviação dos resíduos de nucleotídeos: A, adenina; C, citosina; G, guanina; U, uracila. Abreviação dos resíduos de aminoácidos: I, isoleucina; T, treonina. Adaptado de KEW et al., 2005.

#### 1.10.2.1 Modificações genômicas em poliovírus tipo 2 isolados de casos de poliomielite associados à vacina e de indivíduos vacinados saudáveis

Mutações revertentes em determinantes atenuantes da cepa P2/Sabin têm sido observadas em poliovírus isolados de casos de VAPP. Uma mutação  $A_{481} \rightarrow G$  na região 5'-NCR e mutações nos códons (nucleotídeos 2908, 2909 e 2910) do aminoácido 143-VP1,

levando a substituição do aminoácido atenuante Ile por outros aminoácidos, foram observadas previamente em todas as cepas do tipo 2 isoladas de fezes e/ou SNC de casos VAPP (POLLARD et al, 1989; EQÜESTRE et al., 1991; MUZYCHENKO et al., 1991; MACADAM et al, 1991a, 1993; GUILLOT et al., 1994; GEORGESCU et al., 1994, 1995a). A única exceção em um destes estudos foi uma cepa isolada do SNC de um caso VAPP, que apresentou mutação A<sub>481</sub>→G, mas manteve a Ile<sub>143</sub> atenuante em VP1 (GEORGESCU et al., 1994). Uma mutação de U<sub>398</sub>→C da região 5'-NCR, também foi freqüentemente observada em cepas poliovírus tipo 2 isoladas de casos VAPP (MUZYCHENKO et al., 1991; MACADAM et al., 1991a).

A mutação A<sub>481</sub>→G também foi observada em poliovírus derivados da cepa P2/Sabin isoladas de casos de indivíduos vacinados saudáveis (MINOR & DUNN, 1988; DUNN et al., 1990; MACADAM et al., 1991a, 1993). A substituição de Ile<sub>143</sub> de VP1 por outros aminoácidos, também foi observada em poliovírus derivados da cepa P2/Sabin isolados de fezes de indivíduos vacinados saudáveis, após a multiplicação do vírus no intestino humano, também demonstrando uma seleção contra Ile<sub>143</sub> em VP1 (MACADAM et al., 1993).

Embora mutações sejam importantes para a reversão à neurovirulência da cepa P2/Sabin, o freqüente isolamento de poliovírus tipo 2 recombinantes de casos VAPP sugere que a recombinação genômica também pode estar envolvida no aumento da neurovirulência desta cepa (LIPSKAYA et al., 1991; FURIONE et al., 1993; GEORGESCU et al., 1994; 1995a,b).

Mutações em sítios antigênicos das proteínas do capsídeo também têm sido observadas em poliovírus tipo 2 isolados de casos de VAPP (FIORE et al, 1987), e poderiam agir como um mecanismo de escape contra respostas imunológicas.

Vinte e três isolados derivados de P2/Sabin de amostras de casos de VAPP, de comunicantes saudáveis e de crianças com diagnóstico suspeito de poliomielite no Brasil foram analisados quanto a presença de mutações nas posições 398 e 481 da região 5'-NCR e no aminoácido 143-VP1. O seqüenciamento parcial demonstrou que 10 amostras C<sub>398</sub>, 16 amostras G<sub>481</sub> e 15 amostras com Ser-Asn-Thr-Val em 143-VP1. Uma amostra apresentou U:C<sub>398</sub> aproximadamente na mesma proporção, indicando a presença de pelo menos duas subpopulações, enquanto uma segunda amostra apresentou A<sub>481</sub>→G, indicando que uma pequena população G<sub>481</sub> estava presente (FRIEDRICH et al., 1995).

### 1.10.3 Bases moleculares da atenuação e da reversão à neurovirulência da cepa vacinal P3/Sabin

A cepa atenuada P3/Sabin (P3/Leon 12a1b) foi derivada de uma cepa neurovirulenta selvagem denominada P3/Leon/37, isolada do cérebro e medula espinhal de um caso fatal de poliomielite parálitica em 1937 (RACANIELLO, 1988).

A comparação da seqüência nucleotídica completa da cepa P3/Sabin (STANWAY et al., 1984; TOYODA et al., 1984; WEEKS-LEVY et al., 1991) com sua precursora neurovirulenta P3/Leon/37, e seu revertente neurovirulento P3/119/70 revelou 10 e nove diferenças nucleotídicas respectivamente (WESTROP et al., 1989).

A construção de recombinantes entre a cepa P3/Sabin e a cepa P3/Leon, demonstrou que G<sub>220</sub>→T, C<sub>472</sub>→U da região 5'-NCR e C<sub>2034</sub>→U, levando a uma substituição de Ser<sub>91</sub>→Phe em VP3, são importantes para a atenuação da cepa P3/Sabin em macacos (WESTROP et al., 1989; CHUMAKOV et al., 1991). Estudos sugeriram que U<sub>2493</sub>→C, levando a uma substituição de Ile<sub>6</sub>→Thr de VP1, também apresenta algum efeito na atenuação (WEEKS-LEVY et al., 1991; TATEM et al., 1992). A análise da seqüência nucleotídica do revertente neurovirulento P3/119 sugere que a mutação no nucleotídeo 7432, anterior a cauda poli-A também apresenta um papel na atenuação de P3/Sabin (WESTROP et al., 1989).

A construção de poliovírus recombinantes contendo a região codificante de P2/Lansing e a região 5'-NCR de P3/Leon 12a1b, P3/Leon/37 e P3/119/70 demonstrou que, os isolados que apresentavam C<sub>472</sub> eram neurovirulentos em camundongos, enquanto aqueles que continham a base U nesta posição eram atenuados (LA MONICA; ALMOND; RACANIELLO, 1987). A presença de C<sub>472</sub> aparentemente aumenta a eficiência da translação do RNA viral (SVITKIN et al., 1990). Quando poliovírus recombinantes foram cultivados em linhagem celular de neuroblastoma humano, recombinantes U<sub>472</sub> produziram títulos aproximadamente 10 vezes menores do que vírus neurovirulentos com a base C nesta posição, embora estes vírus tenham replicado igualmente bem em células HeLa (LA MONICA & RACANIELLO, 1989).

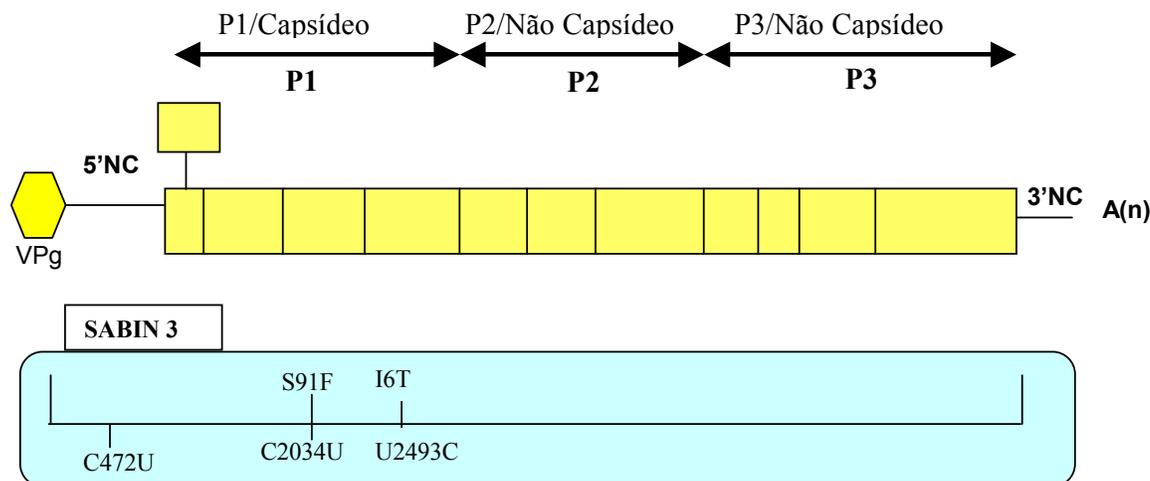
Análises de recombinantes selecionados em temperatura acima de 37°C demonstraram que o fenótipo sensível à temperatura está atribuído a Phe<sub>91</sub> de VP3 da cepa atenuada (FILMAN et al., 1989; MINOR et al., 1991). A localização desta mutação na estrutura sugere que ela deva atuar na desestabilização das interações entre protômeros adjacentes, inibindo a reunião dos protômeros em pentâmeros, impedindo a montagem do virion (MACADAM et al.,

1991b), similarmente a substituição Ieu<sub>18</sub>→Ile de VP2 (MACADAM et al., 1989; FILMAN et al., 1989).

O aminoácido 6 está localizado na região N-terminal de VP1, região esta que atua na entrada do vírus na célula susceptível. Esta região de VP1 é externalizada e a sua exposição é necessária para a ligação dos lipossomas. A substituição de Ile<sub>6</sub>→Thr parece enfraquecer a externalização do N-terminal (FRICK & HOGLE, 1990).

Também foi demonstrado que C<sub>472</sub> são rapidamente selecionadas durante passagens seriadas em células renais de macaco verde africano, utilizadas na produção da vacina (CHUMAKOV et al., 1991; HORIE et al., 2001). Lotes vacinais que falharam no teste de neurovirulência em macacos continham uma proporção maior de vírus contendo C<sub>472</sub> do que nos lotes que passaram no teste (CHUMAKOV et al., 1991; DORSAM et al., 2000).

O nucleotídeo 472 parecia com o nucleotídeo 537 em uma estrutura secundária da região 5'-NCR (PILIPENKO et al., 1989; AGOL, 1991). A base atenuante U no nucleotídeo 472 do RNA viral da cepa P3/Sabin, resulta na alteração de um par de bases C<sub>472-537</sub>→G encontrado na cepa neurovirulenta P3/Leon/37 para um par de bases U<sub>472-537</sub>→G encontrado na cepa P3/Sabin, sugerindo que o fenótipo atenuado está parcialmente associado ao enfraquecimento de um par de bases em uma estrutura secundária altamente conservada (PILIPENKO et al., 1989; AGOL, 1991). A desestabilização da estrutura secundária da região 5'-NCR, causada pela base atenuante U<sub>472</sub>, poderia alterar a interação do RNA viral com um ou mais fatores do hospedeiro necessários para a iniciação da tradução, resultando em uma diminuição da tradução, multiplicação, e neurovirulência viral (SVITKIN; MASLOVA; AGOL, 1985; 1988; AGOL, 1991). A Figura 10 demonstra a localização dos principais nucleotídeos atenuantes na cepa Sabin 3.



**Figura 10: Localização dos principais nucleotídeos atenuantes (barras inferiores) e substituições de aminoácidos (barras superiores) na cepa Sabin 3.** Abreviação dos resíduos de nucleotídeos: A, adenina; C, citosina; G, guanina; U, uracila. Abreviação dos resíduos de aminoácidos: A, alanina; C, cisteína; F, fenilalanina; H, histidinina; I, isoleucina; L, leucina; M, metionina; S, serina; T, treonina; Y, tirosina. Adaptado de KEW et al., 2005.

### 1.10.3.1 Modificações genômicas em poliovírus tipo 3 isolados de casos de poliomielite associados à vacina e de indivíduos vacinados saudáveis

Uma mutação revertente  $U_{472} \rightarrow C$  da região 5'-NCR foi observada em todos os poliovírus derivados da cepa P3/Sabin isolados de fezes e/ou SNC de casos de VAPP, mas  $Phe_{91}$  de VP3 foi mantida na maioria dos casos (ALMOND et al., 1984, 1985; CANN et al., 1984; EVANS et al., 1985; MINOR et al., 1989, MACADAM et al., 1989; GEORGESCU et al., 1994; DRIESEL et al., 1995). Foi sugerido que outras mutações no capsídeo seriam capazes de suprimir o efeito atenuante da  $Phe_{91}$  de VP3 (MINOR et al., 1989; MACADAM et al., 1989; DRIESEL et al., 1995). Uma mutação adicional no aminoácido 54 de VP1, levando a substituição de Ala por Thr ou Val, também foi frequentemente encontrada em poliovírus tipo 3 isolados de casos de VAPP (MINOR et al., 1989; MACADAM et al., 1989). Uma mutação  $G_{143} \rightarrow A$  na região 5'-NCR ocorreu em várias cepas de poliovírus tipo 3 isoladas de casos de VAPP (DRIESEL et al., 1995).

Uma mutação  $U_{472} \rightarrow C$  observada em poliovírus derivados da cepa P3/Sabin isolados de casos de VAPP, também tem sido observada em indivíduos vacinados saudáveis, demonstrando uma forte seleção contra U no nucleotídeo 472 durante a replicação do vírus no intestino humano (EVANS et al., 1985; MINOR & DUNN, 1988; MACADAM et al., 1989; DUNN et al., 1990; TATEM et al., 1991; CONTRERAS et al., 1992; DRIESEL et al., 1995). A substituição de  $Phe_{91} \rightarrow Ser$  de VP3 ou mutações supressoras em proteínas do capsídeo,

também foram observadas em poliovírus tipo 3 isolados de indivíduos vacinados saudáveis (MACADAM et al., 1989; CONTRERAS et al., 1992; DRIESEL et al., 1995).

A recombinação genômica também tem sido observada em poliovírus derivados da cepa P3/Sabin isolados de casos de poliomielite associados à vacina (MACADAM et al., 1989; FURIONE et al., 1993; GEORGESCU et al., 1994; GEORGESCU; DELPEYROUX; CRANIC, 1995; DRIESEL et al., 1995). Mutações em sítios antigênicos também foram observadas em poliovírus tipo 3 isolados de casos de VAPP e de indivíduos saudáveis (MINOR et al., 1986, 1989; MACADAM et al., 1989).

Um vírus derivado recombinante isolado de um caso de VAPP foi encontrado apresentando uma mutação adicional no domínio V da região 5'-NCR no nucleotídeo 510 que resulta no enfraquecimento do par de bases G-C entre os nucleotídeos 488 e 510 (SKINNER et al., 1989). O vírus recombinante perdeu o fenótipo atenuado e sensível a temperatura devido à reversão C<sub>472</sub>. Mutações adicionais foram encontradas no sítio secundário do aminoácido 30-VP2 e/ou 232-VP1, localizado na interface pentamérica e protomérica do vírion respectivamente, 6194 (6203 em P1/Sabin) no códon do aminoácido 73-3D que também está associado a sensibilidade a temperatura e no resíduo 50-VP3 que faz parte do sítio antigênico 3B (MARTIN et al., 2002).

## 1.11 RECOMBINAÇÃO

Teoricamente, a recombinação é um mecanismo mais eficiente de evolução do que mutação pela transferência de um número de propriedades do vírus original em um único evento. A presença de populações variantes de poliovírus ao nível intestinal proporciona uma abundância de material para a seleção de variantes que crescem mais eficientemente (EGGER & BIENZ, 2002).

A recombinação RNA-RNA é alcançada através de dois mecanismos diferentes. A recombinação não-replicativa foi proposta como sendo mediada por estruturas parecidas como ribossomos no genoma de poliovírus, enquanto a recombinação replicativa foi encontrada ocorrendo através de um mecanismo de troca da polimerase durante a síntese da fita RNA negativa. Esta frequência está em torno de 10% a 20% dos recombinantes entre as fitas progênicas, podendo vir a ocorrer ao longo de todo o genoma. Estruturas em forma de duplo *looping* estão envolvidas na recombinação permitindo o alinhamento de fitas parentais através do processo de troca. A recombinação é considerada como sendo importante para a evolução de todos os vírus e para a conservação de todo o genoma, acontecendo numa maior

frequência, nos casos dos poliovírus, após a vacinação com a vacina trivalente oral (EGGER & BIENZ, 2002).

O processo de recombinação, durante a síntese de fitas RNA negativas, requer uma relação próxima entre o doador parental e as fitas RNA positivas receptoras. Existem vários mecanismos nos quais diferentes fitas RNA poderiam trazer essa íntima relação no interior de células infectadas: 1) poderia ser uma interação entre complexos individuais de replicação, por exemplo, pela mudança de RNA através da progênie viral que, liberado a partir de um complexo de replicação, poderia invadir um segundo complexo; 2) vários complexos de replicação poderiam se misturar para formar um complexo contendo mais do que uma fita de RNA parental e, 3) o complexo de replicação poderia ser construído por duas ou mais fitas RNA parentais diferentes e deste modo, conteria mais de uma população RNA se replicando (EGGER & BIENZ, 2002).

#### 1.12 POLIOVÍRUS DERIVADO DA VACINA - RECOMBINAÇÃO

Os poliovírus apresentam a habilidade de recombinar seu material genético, em níveis que superam a maioria, se não todos, os vírus RNA (WIMMER; HELLEN; CAO, 1993). Tal habilidade torna-se mais óbvia entre as cepas vacinais, principalmente devido à natureza da OPV. As recombinações genéticas ocorrem naturalmente em decorrência da capacidade das cepas Sabin em trocar material genético durante a replicação viral no organismo dos vacinados (KEW & NOTTAY, 1984).

A recombinação provavelmente ocorre durante a síntese do RNA de fita negativa (KIRKEGAARD & BALTIMORE, 1986). A administração de OPV proporciona ótimas condições para uma infecção simultânea das células favorecendo a possibilidade de recombinação entre os três genomas de poliovírus. KEW e NOTTAY (1984) descreveram dois isolados obtidos de casos de paralisia em comunicantes de vacinados com a OPV trivalente, e demonstraram que um poliovírus tipo 3 isolado possuía as proteínas de capsídeo do tipo 3 e proteínas não estruturais do poliovírus tipo 2 e, um poliovírus tipo 2 isolado recombinou com o tipo 1 para formar um genoma recombinante S2/S1. MINOR e colaboradores (1986) descreveram o isolamento em pacientes, após a primeira dose de OPV trivalente, de um poliovírus tipo 3 fenotipicamente e genotipicamente instável após o período de 73 dias de excreção. Um isolado recombinante S3/S2 e um isolado apresentando um complexo arranjo genômico S3/S2/S3 foram obtidos após o 8º e o 42º dia de excreção.

A recombinação é um fenômeno comum *in vivo* para poliovírus tipo 3 isolados após a imunização primária com OPV trivalente. A análise dos isolados de seis vacinados através das técnicas de *T1 Rnase oligonucleotide fingerprint* e seqüenciamento do RNA genômico, demonstrou que vacinados excretando poliovírus tipo 3 por longos períodos eventualmente produzem genomas recombinantes com os tipos 1 e 2 (CAMMACK et al., 1988).

Poliovírus derivado da vacina com genomas recombinantes têm ocorrido naturalmente e são freqüentemente isolados tanto de vacinados saudáveis (CAMMACK et al., 1988; CUERVO et al., 2001) como de casos de VAPP (LIPSKAYA et al., 1991; FURIONE et al., 1993; GEORGESCU et al., 1994, 1995; GUILLOT et al., 2000; CUERVO et al., 2001; MARTIN et al., 2002; KEW et al., 2002).

Dois tipos de recombinação têm sido observados: a recombinação intertípica onde os doadores das seqüências são cepas Sabin (Sabin/Sabin) e, a recombinação intratípica, onde segmentos específicos do genoma de vírus Sabin são trocados por seqüências não vacinais derivadas de poliovírus selvagens (GEORGESCU et al., 1995; GUILLOT et al., 2000) ou, de enterovírus não pólio, principalmente os enterovírus do grupo C (KEW et al., 1998, 2002; LIU et al., 2000; BROWN et al., 2003).

Poliovírus recombinantes têm sido isolados em 50% e 67% dos casos envolvendo P2/Sabin e P3/Sabin, respectivamente (FURIONE et al., 1993). Recombinações intertípicas P1/Sabin são raras, mas ocorrem, de fato, seqüências de proteínas não estruturais de P1/Sabin são encontradas nos recombinantes P3/Sabin e P2/Sabin isolados (CUERVO et al., 2001).

A análise combinatória de dois segmentos polimórficos distantes do genoma dos poliovírus (uma na região da proteína de capsídeo VP1 e outra na da região 3D<sup>pol</sup>), de 70 isolados a partir de 84 casos de VAPP coletados na Romênia durante 1980-1990 demonstrou que 49% dos genomas recombinantes pertenciam ao poliovírus tipo 2 e 68% ao poliovírus tipo 3. A maioria dos isolados apresentou genoma recombinante intertípico (vacinal/vacinal), entretanto, seis isolados P2/Sabin e dois isolados P3/Sabin diferiram no perfil dos marcadores de RFLP (“*Restriction Fragment Length Polymorphism*”) para a região 3D das cepas Sabin em mais de um sítio de restrição, sugerindo recombinação com vacinal/não vacinal (FURIONE et al., 1993).

GEORGESCU e colaboradores (1994) detectaram oito isolados com genoma recombinante de casos de VAPP na Romênia. A maioria foi facilmente reconhecida como recombinantes intertípicos vacina/vacina através de marcadores de RFLP (S2/S1, S3/S1, S3/S2, S2/S3/S1 e um genoma quádruplo S2/S3/S2/S3), entretanto, um isolado apresentou perfis atípicos (S2/não vacinal).

Marcadores de RFLP direcionados para a região C-terminal da 3D<sup>pol</sup> e para a região 3'-NCR do genoma de 138 isolados demonstrou que os sítios de junção de recombinação encontravam-se localizados na região codificante das proteínas não estruturais (regiões P2 e P3), proteínas envolvidas na clivagem proteolítica e na replicação genômica e, que a maioria das junções do tipo 2 encontrava-se na região de P3 (3A e 3D<sup>pol</sup>) enquanto a maioria do tipo 3 estava na região de P2 (2A e 2C) (CUERVO et al., 2001).

Apesar das junções de recombinação serem geralmente localizadas na região codificante das proteínas não estruturais, em alguns isolados, entretanto, os sítios de recombinação residem na região das proteínas de capsídeo (MARTIN et al., 2002). Um poliovírus recombinante P2/Sabin/selvagem isolado de um caso de VAPP na Romênia (GEORGESCU et al., 1994) apresentou um genoma contendo a região de capsídeo de P2/Sabin sendo flanqueada em suas extremidades por duas unidades de origem não vacinal. A parte central incluía a região codificante das proteínas de capsídeo e o N-terminal da protease 2A (a partir do aminoácido 8 de VP4 ao aminoácido 69 de 2A). A primeira unidade genômica não vacinal era a região 5'-NCR inteira enquanto, a segunda, era quase toda a região das proteínas não estruturais e a região 3'-NCR. As duas extremidades de origem não vacinal da cepa isolada foram comparadas com todas as cepas de poliovírus vacinais, poliovírus selvagens e enterovírus não pólio. A primeira unidade genômica apresentou similaridade com seqüências de poliovírus igual ou maior que 97,9%, enquanto o doador da seqüência na região 5'-NCR não pode ser identificado (GEORGESCU et al., 1995).

A porcentagem dos isolados contendo genomas recombinantes varia consideravelmente de acordo com o sorotipo. Entre 134 isolados analisados 82% foram P3/Sabin e 62 % P2/Sabin. Dos 55 isolados P1/Sabin, um era uma mistura recombinante e não um genoma recombinante. Parece existir uma associação preferencial dos segmentos genômicos de acordo com o sorotipo de origem. O tipo P2/Sabin recombinante foi mais freqüentemente associado com segmentos do genoma de P1/Sabin (20 S2/S1 contra seis S2/S3). Igualmente, P3/Sabin preferiu segmentos genômicos derivados de P2/Sabin (26 S3/S2 contra seis S3/S1). Segmentos genômicos P1/Sabin foram mais freqüentemente associados a P2/Sabin do que a P3/Sabin (20 S2/S1 contra seis S3/S1) (CUERVO et al., 2001).

A cinética da excreção de cepas recombinantes em vacinados indica que genomas recombinantes podem ser excretados durante a primeira semana após a primeira dose da vacina e que uma relativa abundância das cepas recombinantes, de acordo com o sorotipo, ocorre no 14º dia (CAMMACK et al., 1988). Possivelmente, durante os 14 dias que se seguem a vacinação, exista uma replicação simultânea das cepas vacinais no organismo, otimizando as chances de dois vírus infectarem a mesma célula e em decorrência disto, trocar material

genético através de recombinação. Depois disto, a imunidade intestinal dos vacinados e fatores desconhecidos no hospedeiro podem restringir a replicação de alguns sorotipos e deste modo limitar a possibilidade de eventos adicionais de recombinação. Isto sugere que o nível e as características dos recombinantes são determinados pela cinética da replicação de cada um dos três sorotipos. A maioria dos vacinados excreta primeiro o poliovírus do tipo 1, depois o tipo 2, e finalmente o tipo 3, o que explicaria porque o tipo 2 recombina mais freqüentemente com tipo 1 e o tipo 3 com tipo 2 (CUERVO et al., 2001).

Um vírus isolado de um caso de VAPP na Bielorrússia foi caracterizado através dos testes de diferenciação intratípica e pela utilização de anticorpos monoclonais Sabin específicos como um poliovírus tipo 3 não-Sabin-like. A análise da seqüência nucleotídica completa da região de VP1 e de parte da protease 2A revelou um genoma recombinante intertípico P3/Sabin/P2Sabin com uma junção dentro da região de capsídeo. Este evento de recombinação resultou na inserção de uma seqüência de 120 nucleotídeos de P2/Sabin na porção 3' terminal de VP1 no genoma de P3/Sabin. Uma análise posterior revelou uma estrutura genômica S3/S2/S1 derivado com os sítios de junção localizados nos nucleotídeos 3251-3258 (porção 3' terminal de VP1) e 4988-4996 (porção 3' terminal de 2C e a região das proteínas estruturais) (MARTIN et al., 2002).

GUILLOT e colaboradores (2000) analisando 88 isolados de casos de VAPP na Romênia demonstraram cinco isolados carregando seqüências de origem não vacinal. O seqüenciamento combinado das regiões VP1, 2C, 3D<sup>pol</sup> e 3' terminal do genoma através de marcadores de RFLP demonstrou que 76% dos isolados implicados nestes casos de VAPP tinham genomas recombinantes. A análise destes casos de VAPP indica que a recombinação de cepas OPV não está restrita as cepas poliovírus, mas poderia envolver enterovírus não pólio. A maioria destes recombinantes foi vacinal/vacinal, entretanto, cinco isolados mostraram segmentos genômicos não vacinal sendo classificados como recombinantes vacinal/selvagem. Para um isolado, a seqüência nucleotídica da região de 3D<sup>pol</sup> identificou o doador da seqüência vacinal de um isolado como P1/Sabin, enquanto os outros quatro recombinantes não puderam ter o doador da seqüência selvagem identificado. O alinhamento das seqüências dos poliovírus tipo 1 isolados no surto ocorrido na ilha de Hispanhola revelou que a região codificante das proteínas não estruturais dos genomas era proveniente de cepas enterovírus não pólio (KEW et al., 2002).

### 1.13 HISPANHOLA

O último caso de poliomielite nas Américas associado com a circulação de vírus selvagem foi detectado em Junin, Peru em 1991 (DE-QUADROS et al., 1997). O último caso de poliomielite no Caribe ocorreu na ilha de Hispanhola, que está dividida entre a República Dominicana (onde o último caso descrito foi em 1985) e Haiti (onde o último caso notificado foi em 1989). Desde 1992, a investigação de aproximadamente 20.000 casos de AFP por toda a América (DE-QUADROS et al., 1997) tem sido somente de casos esporádicos de VAPP (ANDRUS et al., 1995).

O único caso conhecido de infecção por poliovírus selvagem nas Américas depois de 1991, foi associado a importações para dentro do Canadá em 1993. O contato entre grupos religiosos holandeses com objeções à vacinação e a comunidade canadense, de similar filiação religiosa, ocasionou um surto do P3/selvagem. O seqüenciamento de amplicons gerados a partir da região 5'-NCR e da porção VP1/2A dos genomas dos isolados, indicaram uma similaridade genética maior do que 99% com a cepa holandesa. Nenhuma destas importações estava associada com a doença paralítica, e não houve nenhuma evidência da disseminação do vírus por toda a comunidade (DEBROT et al., 1997).

No verão de 2000, casos de AFP foram descritos em Bonao, República Dominicana, e Port-de-Paix, Haiti, comunidades que se encontram separadas por aproximadamente 300 km. Amostras destes pacientes foram positivas para o poliovírus tipo 1. Uma caracterização inicial dos isolados através da utilização de conjuntos de sondas poliovírus genotipo-específico RNA, que especificamente reconhecem o genoma da cepa Sabin-poliovírus relacionados, indicou que estes eram poliovírus derivados da vacina (DE et al., 1995). Entretanto, várias observações levantaram a suspeita de que os casos de AFP em Hispanhola poderiam ser causados pela circulação de poliovírus selvagem: (1) os pacientes tinham paralisia residual; (2) os casos ocorreram no pico da estação de transmissão dos enterovírus (e poliovírus); (3) um paciente não foi imunizado e um outro foi imunizado incompletamente (apenas uma dose de OPV foi administrada); e (4) o poliovírus tipo 1 é o primeiro agente de surtos de poliomielite (PATRIARCA; SUTTER; OOSTVOGEL, 1997). Uma caracterização da seqüência de dois isolados, comparando a proteína VP1, demonstrou que eles não eram relacionados [identidade de VP1 <82%] aos P1/selvagens previamente endêmicos em Hispanhola ou nas Américas ou a qualquer poliovírus rotineiramente encontrado em outras partes do mundo (KEW et al., 1995). Em contraste, os isolados haitianos e dominicanos demonstraram 97,4 e 98,0% de identidade de VP1, respectivamente para a cepa P1/Sabin OPV. Entretanto, o grau de similaridade da seqüência de VP1 para a cepa OPV foi

substancialmente menor que a normalmente observada (>99,5%) nos isolados a partir de casos de AFP ou VAPP (MMWR, 2000). Além disso, a afinidade entre as seqüências de dois isolados sugeriram que estes eram derivados de um recente ancestral comum, como é típico dos poliovírus selvagens isolados durante um surto.

Durante o período de um ano, 123 casos de AFP foram notificados na República Dominicana, 13 destes foram confirmados como pólio pelo isolamento do poliovírus tipo 1 a partir de pacientes ou de seus comunicantes. No Haiti, 33 casos de AFP foram investigados no período de agosto de 2000 a julho de 2001. Sete casos adicionais associados com o cVPDV do tipo 1 foram encontrados em 2001. Dois pacientes morreram de poliomielite bulbar. Somente um paciente recebeu as três doses de OPV, 11 pacientes não foram vacinados, sete foram vacinados incompletamente e, dois pacientes não tinham o estado de vacinação conhecido (KEW et al, 2002).

O poliovírus do tipo 1 VDPV foi isolado de 19 pacientes e 12 comunicantes nos dois países. Todos os 31 isolados eram estreitamente relacionados e pareciam ser a progênie de uma recente infecção comum de OPV. A diversidade de nucleotídeos de VP1 dos isolados haitianos (0,030 diferenças por sítio de nucleotídeo) foi substancialmente maior do que a dos isolados dominicanos (0,007 diferença nucleotídica por sítio). Os isolados do norte do Haiti foram mais estreitamente relacionados entre si do que os isolados provenientes do sul, os quais por sua vez representaram três linhagens distintas (KEW et al, 2002).

Os tempos aproximados dos eventos na história da transmissão de surto de um vírus podem ser estimados a partir da seqüência de VP1 entre os isolados, das datas de coletas dos espécimes, e do grau de evolução de VP1. Por assumir que a grau de evolução no interior de VP1 foi de 0,030 substituição por sítio sinônimo por ano, KEW e colaboradores (2002), estimaram que a dose inicial de OPV ocorreu no final de 1998 ou no início de 1999 e que as linhagens do norte e do sul do Haiti divergiram em meados de 1999 enquanto as linhagens do sul divergiram novamente poucos meses depois. A proximidade da relação das seqüências entre os isolados dominicanos sugeriu que um ancestral comum ocorreu na primavera de 2000 (KEW et al., 2002).

Todos os vírus isolados do surto ocorrido na ilha de Hispanhola eram recombinantes. As seqüências da região 5'-NCR e a região do capsídeo eram derivadas de P1/Sabin, enquanto a maioria das seqüências não capsídeo eram derivadas de outras espécies de enterovírus C (OBERSTE et al., 1999b).

Um bloco de seqüências recombinantes (posição 3811 para aproximadamente 3952; região 2A<sup>PRO</sup>/2B) foram compartilhadas em todos os isolados do surto. Uma relação próxima (93,7 para 100% de identidade) entre seqüências dentro deste bloco proporcionou uma forte

evidência da sua introdução por um simples evento de recombinação e confirmou que o vírus do surto era derivado de uma única fonte de infecção. Seqüências da região de não capsídeo de 21 isolados dominicanos foram geralmente muito similares, exceto para os isolados de três comunicantes de um caso em Navarrete, no qual a seqüência da região 3D<sup>pol</sup> derivava de um outro enterovírus. A relação entre as seqüências não capsídeo de 10 isolados e do isolado em Pilate tinha pontos de quebra de recombinação em comum com o principal grupo dominicano. Entretanto, os isolados de casos de Port-de-Paix e de um caso fatal de Port-au-Prince diferem em suas seqüências da região não capsídeo de outros isolados haitianos e dominicanos e a partir de cada um. Pelo menos quatro diferentes enterovírus recombinaram com o poliovírus tipo 1 VDPV durante sua circulação em Hispanhola (KEW et al., 2002).

Os cVDPVs isolados do presente surto recuperaram duas das mais importantes propriedades biológicas dos poliovírus selvagens: a capacidade de causar doença paralítica severa em humanos e a capacidade da extensiva transmissão pessoa-pessoa.

Todos os 31 isolados tinham a substituição nucleotídica G<sub>480</sub>→A da região 5'-NCR e, outros alelos que conferem atenuação para P1/Sabin também reverteram (nas posições 6143, 6203, 7071, e 7441). As propriedades genéticas dos isolados do surto foram consistentes com suas associações com a doença paralítica em humanos e com outras propriedades determinadas experimentalmente. O primeiro dos dois isolados foi encontrado como sendo altamente neurovirulentos para camundongos transgênicos expressando o receptor humano para poliovírus, e ao contrário de P1/Sabin, foi capaz de replicar em altos títulos em células HeLa a 39,5°C (KEW et al, 2002).

A circulação de VDPV ocorreu num ambiente de baixa cobertura vacinal por todo o Haiti e em partes da República Dominicana. No Haiti, níveis de cobertura com as três doses de OPV para crianças com idade inferior a um ano foram os menores nas Américas (cerca de 30% de 1992 para 1997) e cerca de 60% no ano de 2000. Os níveis de cobertura nacionais foram altos na República Dominicana (de 72% para 84% de 1993 a 2000), mas a cobertura foi muito baixa (20% a 30%) nas comunidades do surto (KEW et al., 2002).

As falhas na cobertura vacinal foram acompanhadas pela falha na vigilância, especialmente no Haiti. Contudo, uma reconstrução razoável dos eventos que levam a um surto pode ser avaliada a partir de dados epidemiológicos e virológicos combinados. O surto provavelmente começou no Haiti, quando a dose de rotina de OPV foi dada a uma criança morando numa comunidade com uma baixa cobertura vacinal. O surto na República Dominicana começou com a importação do vírus VDPV de linhagem haitiana em uma comunidade com baixa cobertura vacinal de OPV.

Os poliovírus tipo 1 e tipo 3 selvagens foram endêmicos nas Filipinas até 1993, e a região, juntamente com outros países do oeste do Pacífico, receberam a certificação de área livre de poliovírus selvagem em 2000. Casos de AFP continuam e a pesquisa de poliovírus nas Filipinas não tem detectado qualquer infecção por vírus selvagem após 1993 (SHIMIZU et al., 2004; MMWR, 2001a).

Entretanto, durante o período de março a julho de 2001, três casos de AFP associados a cVDPVs foram descritos nas Filipinas. O primeiro paciente, um menino de oito anos de idade do norte da ilha de Mindanao, apresentou sinais de paralisia em 15 de março de 2001. O segundo paciente, uma menina de três anos de idade, da ilha de Luzon, apresentou sinais de meningite em 21 de julho de 2001. Ambos os pacientes receberam as três doses de OPV. O terceiro paciente, um menino de 14 meses de idade da província de Cavite, com histórico de duas doses de OPV, apresentou sinais de paralisia em 26 de julho de 2001. Somente o terceiro caso teve paralisia residual 60 dias após a data do início dos sintomas. Nenhum dos pacientes tinha viajado para fora das suas áreas de residência desde a data do seu nascimento, e nenhuma ligação epidemiológica direta entre os três casos de AFP foi encontrada. Uma amostra de fezes foi coletada de um comunicante saudável do terceiro paciente da província de Cavite em 23 de setembro de 2001 (SHIMIZU et al, 2004; MMWR, 2001a).

O nível de cobertura vacinal com as três doses de OPV tem sido de aproximadamente de 80% nas Filipinas desde aos anos 90. Entretanto, falhas na imunidade provavelmente ocorreram em 1997, quando a campanha nacional de imunização em massa com a OPV foi pela última vez conduzida nas Filipinas. A imunização subnacional que cobriu as áreas urbanas de Manila, Cebu, e Davao e partes de Mindanao seguiram em 1998 e 1999, mas não incluíram as três províncias onde ocorreram os casos de cVDPVs (MMWR, 2001a).

Todos os quatro isolados foram identificados através de microneutralização como poliovírus tipo 1. Os métodos de hibridização por sonda de RNA e PCR identificaram os isolados como Sabin 1-*like*, mas apresentaram antigenicidade semelhante ao não Sabin-*like* pela diferenciação intratípica por ELISA. Estes isolados foram caracterizados pela análise das suas seqüências nucleotídicas de VP1. A análise da seqüência de VP1 determinou que os poliovírus tipo 1 isolados eram estritamente relacionados com P1/Sabin, diferenciando em 3,1% (Mindanao-01-1 e Luzon 01-2), 3,4% (Luzon-01-1) e 3,5% (Luzon-01-2c) identidade, indicando que todos eram cVDPVs. Uma análise filogenética mais detalhada da seqüência genômica entre os cVDPVs isolados revelou que eles foram muito relacionados entre eles (99,0% a 99,9% de identidade nucleotídica). Resultados do GenBank determinaram que o

mais próximo relacionado com os cVDPVs das Filipinas era P1/Sabin. O seqüenciamento completo dos genomas dos isolados cVDPVs revelou que todos eram recombinantes entre P1/Sabin e um vírus não Sabin. A identidade das seqüências entre P1/Sabin e Mindanao-01-1 foi  $\geq 96\%$  nas regiões 5'NCR, de capsídeo e 2AB e  $< 85\%$  na região de não capsídeo. Os outros isolados cVDPVs mostraram seqüências muito similares com P1/Sabin, e os quatro compartilharam  $\cong 99\%$  de identidade nucleotídica entre eles. Os quatro isolados apresentaram uma recombinação comum num sítio localizado no meio da região 2B (entre os nucleotídeos 3927-3949) (SHIMIZU et al, 2004).

A seqüência da região de não capsídeo dos isolados filipinos foi relacionada a outros poliovírus (as três cepas Sabin e os isolados de Hispanhola com diferentes seqüências de não-capsídeo), e enterovírus da espécie C, mas nenhuma seqüência com  $> 95\%$  de identidade foi encontrada. Este sugere que a seqüência da região de não capsídeo recombinante deve ser classificada dentro do grupo da espécie C dos enterovírus (SHIMIZU et al, 2004; BROWN et al., 2003).

A seqüência genômica completa dos quatro cVDPVs foram comparadas com aquelas de P1/Sabin e do parente neurovirulento Mahoney. Os quatro cVDPVs compartilharam  $G_{480} \rightarrow A$  do domínio V da região 5'NCR e nas posições 7410 e 7441 de 3'NCR. Os cVDPVs isolados também diferenciaram-se de Sabin em nove reversões de aminoácidos para o parente Mahoney. Entre as três reversões de aminoácido nas proteínas de capsídeo, duas alterações de aminoácidos em VP1 (VP1-99 e VP1-106) foram localizadas dentro do sítio 1 de neutralização antigênica. Quatro diferenças de aminoácidos foram mapeadas na região 3D<sup>pol</sup> (resíduos 53, 73, 250 e 362) (SHIMIZU et al, 2004).

Os isolados Mindanao 01-1 e Luzon 01-2 demonstraram potente neurovirulência em camungongos PVR-Tg1 enquanto o isolado Luzon 01-2c exibiu moderada atenuação ou neurovirulência. Os isolados Mindanao 01-1, Luzon 01-2 e Luzon 01-01 apresentaram moderada sensibilidade à temperatura. A exceção foi Luzon 01-2c que apresentou baixa sensibilidade (SHIMIZU et al, 2004).

A relação entre as seqüências dos isolados sugeriu que a circulação de VDPV teve início em 1998. Embora os três casos tenham ocorrido em comunidades separadas, a estreita similaridade entre as seqüências dos isolados sugere que o vírus se disseminou via uma única cadeia minimamente ramificada, em contraste com o desenho da transmissão em multi-cadeia encontrada nos casos em Hispanhola (SHIMIZU et al, 2004).

Cinco casos de AFP associados com o poliovírus tipo 2 cVDPV foram descritos em duas diferentes comunidades no sul da província de Madagascar durante o período de outubro de 2001 a abril de 2002. O primeiro caso foi isolado no distrito urbano de Toliara e os quatro casos restantes foram oriundos de um distrito rural de Taolagnaro. O último caso veio de um comunicante de um dos três casos de Taolagnaro. Nenhum dos pacientes havia recebido tratamento completo com as três doses de OPV (ROUSSET et al., 2003).

Os perfis dos marcadores de RFLP das regiões VP1/2A (nucleotídeos 2872 e 3647) de todos os isolados foram idênticos aos de P2/Sabin, mas apresentaram diferenças nas regiões VP3/VP1 (nucleotídeos 1915 a 2883), permitindo distinguir dois grupos (isolados de Toliara e isolados de Taolagnaro) e dois subgrupos (isolados de março e de abril). O perfil dos marcadores de RFLP das regiões de não capsídeo, 3D<sup>pol</sup> e 3'-NCR (nucleotídeos 6535 e 7439) também contribuíram para confirmar a existência de dois grupos separados. Este último perfil foi completamente diferente daqueles para as três cepas vacinais, sugerindo recombinação com outros enterovírus. O seqüenciamento da região de não capsídeo confirmou a existência de duas linhagens derivadas a partir de eventos de recombinação com dois enterovírus não identificados pertencentes ao cluster filogenético C. A região de VP1 dos poliovírus tipo 2 isolados de Toliara e Taolagnaro diferiram da cepa Sabin em 1% a 2,5 % de nucleotídeos respectivamente. Esta diferença pode indicar que as duas cepas isoladas vêm se replicando e circulando por aproximadamente um a 2,5 anos, respectivamente. Os isolados da área rural foram mais relacionados entre si (<1% de diferença nucleotídica) e diferentes das cepas rurais (2,9% de diferença nucleotídica), indicando a existência de duas linhagens genéticas (ROUSSET et al., 2003).

A última notificação de poliovírus selvagem foi em 1997 e deste modo, acredita-se que os VDPVs detectados sejam produtos de recombinação entre as cepas OPV e dois enterovírus não pólio (ROUSSET et al., 2003).

A detecção de duas linhagens distintas de cVDPV em Madagascar indica o potencial de que cVDPVs possam emergir, independentemente, em localidades onde há falhas na imunização (ROUSSET et al., 2003).

O último poliovírus tipo 2 selvagem caracterizado no Egito foi isolado de um caso em 1979. Entretanto, o último ano da circulação do poliovírus selvagem é desconhecido, pois a vigilância para os casos de AFP e poliovírus selvagem só foi iniciada no país depois da década de 90 (YANG et al., 2003).

De 1988 a 1993, o poliovírus tipo 2 foi frequentemente isolado de pacientes com poliomielite clinicamente confirmada. A maior parte dos pacientes não era imunizada e nenhum histórico de exposição recente a OPV foi relatado, sugerindo a continua circulação de P2/selvagem. Esta suposição foi reforçada pelo achado de 30 poliovírus tipo 2 isolados que apresentaram propriedades antigênicas duplamente reativas (propriedades antigênicas tanto de P2/Sabin como de P2/selvagem) quando no teste de diferenciação intratípica usando a técnica de ELISA. Os testes de hibridização com sonda nucléica e diagnóstico por PCR revelaram que os 30 isolados eram geneticamente relacionados com P2/Sabin. A seqüência nucleotídica de VP1 de dois isolados, Qalyubiya/88-1 e BeniSuef/93, foram comparados com a seqüência de P2/Sabin, três isolados P2/selvagens e nove isolados P2/selvagens provenientes de casos ocorridos na Ásia, África, Europa e América do Sul durante 1977 e 1991. Os dois isolados Qalyubiya/88-1 e BeniSuef/93 foram claramente identificados como cVDPVs, apresentando uma identidade de seqüência de VP1 mais próxima com P2/Sabin de 97,2% e 93,3% respectivamente, do que com qualquer um dos poliovírus selvagens (76,6% a 81,1% de identidade nucleotídica de VP1). Os isolados Qalyubiya/88-1 e BeniSuef/93 compartilharam 15 substituições nucleotídicas de VP1 distinguindo-se de P2/Sabin, compatível com suas derivações a partir de uma infecção ancestral comum. Para visualizar os mecanismos de divergência entre os isolados, estes foram agrupados em 11 grupos de linhagens genéticas, que correspondem a mecanismos independentes de evolução divergindo a partir de P2/Sabin. O grupo mais relacionado apresentou uma média de 26 diferenças nucleotídicas em VP1 e o grupo mais distante teve uma média de 73 diferenças nucleotídicas entre eles (YANG et al., 2003).

A análise de regressão de VP1 para o nível de evolução sugere que todas as linhagens derivaram de uma única fonte de infecção de OPV que ocorreu durante 1982, e que a progênie da infecção inicial circulou pelo Egito durante 1982-1993. As seqüências das regiões 5'-NCR dos isolados Qalyubiya/88-1 e BeniSuef/93 foram aparentemente derivadas de outros vírus diferentes de P2/Sabin (<85 % de identidade de seqüência de nucleotídeo para a região 5'-NCR de P2/Sabin). A identidade nucleotídica das seqüências das regiões de não capsídeo e 3'-NCR dos isolados Qalyubiya/88-1 e BeniSuef/93 foram 82,7% e 83,2%, respectivamente,

com P2/Sabin e de 86,4% identidade de seqüência entre eles. As seqüências entre P2/Sabin e Qalyubiya/88-1 e BeniSuef/93 sugerem que pelo menos dois eventos de recombinação ocorreram tanto na região 5'NCR como na região de não capsídeo durante a evolução de cVDPV. As seqüências heterólogas não foram identificadas com qualquer P1/Sabin ou P3/Sabin ou qualquer outro poliovírus caracterizado e foram mais relacionadas com o grupo de C enterovírus (MMWR, 2001b; YANG et al., 2003).

Ambos os isolados Qalyubiya/88-1 e BeniSuef/93 apresentavam G<sub>481</sub>, mas diferentemente da maioria dos isolados Sabin-*like*, as seqüências 5'-NCR envolvidas provavelmente derivaram de outros enterovírus. Os isolados Qalyubiya/88-1 e BeniSuef/93 dividiram a mesma troca de aminoácido Ile→Thr na VP1-143. Os testes em camundongo PVR-Tg21 demonstraram que os isolados eram neurovirulentos como o P2/selvagem isolado em 1942. BeniSuef/93 apresentou propriedades antigênicas semelhantes ao da cepa vacinal, com uma substituição nucleotídica U<sub>2909</sub>→A em VP1 (YANG et al., 2003).

#### 1.17 POLIOVÍRUS DERIVADO DA VACINA ASSOCIADO À IMUNODEFICIÊNCIA

Os poliovírus podem ser encontrados na orofaringe durante 1-2 semanas após a infecção, e de 1-2 meses no intestino. A excreção pode ser intermitente, mas os poliovírus podem ser encontrados nas fezes de virtualmente todos os pacientes com poliomielite. Em seguida, a taxa de excreção fecal diminui 10%-15% por semana dentro do primeiro mês após o início da paralisia (ALEXANDER; GARY; PALLANSCH, 1997).

Não existem relatos de pessoas imunocompetentes como carreadores de poliovírus durante longos períodos. Uma vez que a excreção viral nas fezes tenha cessado, o indivíduo deixa de ser fonte de infecção. Entretanto, a replicação dos poliovírus pode ocorrer por períodos prolongados entre indivíduos imunocomprometidos (DOWDLE & BIRMINGHAM, 1997).

Indivíduos imunodeficientes representam um reservatório potencial para a reintrodução de poliovírus após a erradicação da poliomielite devido à possível excreção crônica das cepas vacinais. Após a exposição à OPV, pessoas imunocompetentes excretam o vírus vacinal por um tempo limitado, geralmente não superior a 2 a 3 meses (ALEXANDER; GARY; PALLANSCH, 1997). Em contraste, durante a replicação em indivíduos imunodeficientes, particularmente aqueles com deficiência de células B associadas a hipogamaglobulinemia, podem apresentar uma excreção bastante prolongada e por períodos variados: 684 dias (HARA et al., 1981), 3,5 anos (DOWDLE & BIRMINGHAM, 1997) e 5,5

anos (BELLMUNT et al, 1999). Neste último caso o poliovírus tipo 1 foi isolado a partir de amostras de um paciente portador de síndrome da imunodeficiência comum variável (CVID-*“Common Variable Immunodeficiency Syndrome”*).

A vacina OPV é contra-indicada em pessoas imunodeficientes em função do alto risco de VAPP, entretanto, na maioria dos casos, a imunização com a vacina oral ocorre antes do diagnóstico da imunodeficiência.

Indivíduos portadores de deficiência primária de células B e T apresentam um risco de VAPP três vezes maior do que indivíduos imunologicamente competentes (SUTTER & PREVOTS, 1994).

Um estudo desenvolvido na década de 60 na Inglaterra descreveu que 28 de 30 indivíduos anticorpo-deficientes que receberam OPV monovalente excretaram poliovírus por mais de um mês. Dois indivíduos deste estudo desenvolveram um período longo de excreção (> 6 meses), um excretando o poliovírus tipo 1 e outro o tipo 3 (citado por WOOD et al., 2000). Em 1977, um paciente com agamaglobulinemia apresentou excreção de poliovírus tipo 2 por dois anos após o início da poliomielite (HARA et al., 1981).

Pacientes com deficiência seletiva de IgA foram imunizados com OPV na campanha nacional na Finlândia em resposta ao P3/selvagem em 1984. Amostras de fezes de oito pacientes que receberam dose única de OPV foram coletadas entre os dias dois e 35 e novamente seis meses. Os pacientes com deficiência de IgA excretaram poliovírus por períodos mais longos do que os controles imunologicamente competentes, entretanto, nenhum período foi superior a seis meses (SAVILAHTI et al., 1988).

Um estudo retrospectivo de 37 pacientes de casos de VAPP ocorridos nos Estados Unidos durante o período de 1975-1997 revelou que a prevalência entre pacientes imunodeficientes com VAPP excretando poliovírus por mais de seis meses foi maior que 16,2% ou um em seis pacientes. A prevalência da persistência de poliovírus entre os pacientes declina com o tempo após a última dose de OPV: após seis meses, seis pacientes (19,4%) ainda eliminavam poliovírus, em um ano, três (14,3%), em cinco anos apenas um (4,8%). Nenhum paciente após 10 anos, desde a última exposição, a OPV foi encontrado excretando poliovírus (KHETSURIANI et al., 2003).

Dois isolados de poliovírus tipo 1 coletados de duas amostras fecais, uma no início da paralisia e a outra coletada 5,5 anos após o aparecimento do quadro de paralisia, demonstraram 5,4% e 8,3% de diferença nucleotídica em relação à cepa vacinal. Ambos os isolados apresentaram as reversões nucleotídicas 480 e 6203 relacionadas ao genótipo selvagem (BELLMUNT et al., 1999).

MARTIN e colaboradores (2000) descreveram as características genéticas e fenotípicas de sete amostras sequenciais do poliovírus tipo 3 isoladas de uma paciente hipogamaglobulinêmica, que excretou o poliovírus tipo 3 por 637 dias após ter sido imunizada com a vacine monovalente Sabin 3. Todos os isolados apresentaram a reversão U<sub>472</sub>→C na 5'-NCR e Phe<sub>91</sub>→Ser emVP3. As amostras foram coletadas a partir do dia 36 até o dia 637 após a vacinação, quando a excreção parece ter cessado espontaneamente. Durante os 21 meses de excreção, a paciente não apresentou qualquer sintoma de paralisia.

A análise da seqüência de VP1 de poliovírus tipo 1 VDPV isolado de um caso VAPP de um paciente portador de CVID, demonstrou que o isolado divergia da seqüência da cepa Sabin aproximadamente em 10%, sugerindo que o poliovírus havia se replicado cerca de sete anos antes do início da doença paralítica (KEW et al., 1998). A análise molecular de um poliovírus tipo 2 VDPV isolado de um paciente portador de CVID mostrou mais de 10% de divergência com a cepa P2/Sabin sugerindo que este paciente tenha excretado poliovírus por mais de 10 anos (WOOD et al., 2000).

Infecções persistentes por poliovírus derivado da vacina associado à imunodeficiência (iVDPV) tem sido notificadas em regiões com níveis altos ou intermediários de desenvolvimento, onde a taxa de cobertura com OPV é elevada e aonde a expectativa de vida dos pacientes imunodeficientes pode ser prolongada através de tratamento clínico apropriado. Um poliovírus tipo 1 iVDPV isolado de um caso na Rússia, de uma população aparentemente imunizada, exibiu propriedades antigênicas não-Sabin-like quando analisado através dos testes de diferenciação intratípica. O perfil de VP1 do poliovírus tipo 1 isolado, através da análise por PCR-RFLP demonstrou ser este idêntico a P1/Sabin, enquanto os perfis das regiões 2AB e 3D foram similares a P2/Sabin. O sequenciamento completo do genoma revelou um duplo recombinante entre P1/Sabin e P2/Sabin (S1/S2/S1). O primeiro sítio de junção ocorreu na região VP1/2A e o segundo, no meio de 3D (CHERKASOVA et al., 2002).

Entretanto, excretores crônicos parecem ser bastante raros. Nenhum período longo de excreção foi observado numa pesquisa realizada com 306 pacientes de deficiência de IgG nos Estados Unidos, México, Brasil e Inglaterra, e com 40 pacientes com deficiência de IgA nos Estados Unidos (HALSEY et al., 2004).

A paralisação da vacinação com a OPV irá inevitavelmente resultar num decréscimo da população imunizada e criar a oportunidade de uma possível reintrodução de poliovírus e de VDPVs na população suscetível. Excretores crônicos representam um sério risco a população. Um estudo retrospectivo na suspensão do uso de OPV na Bielorrússia em 1963-1966 demonstrou a disseminação e evolução de linhagens independentes de VDPVs. Três isolados apresentaram genomas recombinantes contendo a região 5'-NCR e a região de

capsídeo derivada de P2/Sabin, dois destes contendo as regiões das proteínas não estruturais de P1/Sabin e, outro de um vírus não identificado (KOROTKOVA et al., 2003).

#### 1.18 POLIOVÍRUS DERIVADO DA VACINA – MEIO AMBIENTE

A vigilância ambiental é epidemiologicamente importante, pois reflete as propriedades do vírus circulante na comunidade (DIVIZIA et al., 1999; SHULMAN et al., 2000), avalia o risco potencial de infecção a partir do meio ambiente e de alimentos (JAYKUS, 1997) e, avalia a eficiência das campanhas de imunização para eliminação do tipo selvagem, especialmente durante os últimos estágios para a erradicação da poliomielite (DESHPANDE; SHETTY; SIDDIQUI, 2003).

SEDMAK e colaboradores (2003) demonstraram a importância de testes de rotina em amostras coletadas a partir do meio ambiente (esgoto) como suplemento aos testes realizados em amostras clínicas, utilizadas no diagnóstico dos Enterovírus. A correlação amostra clínica-meio ambiente não foi igual a 100% porque um maior número de sorotipos de Enterovírus foi detectado clinicamente do que em amostras do meio ambiente, e alguns sorotipos isolados nas amostras de esgoto nunca foram detectados nas espécimes clínicas.

O levantamento de poliovírus ambiental é um poderoso método para a monitoração da circulação de poliovírus em populações que apresentam alto nível de cobertura vacinal, mas que se encontram próximas a regiões geográficas de endemicidade (SHULMAN et al., 2000) e na de pesquisa de poliovírus tipo selvagem circulante na ausência de casos de AFP (HOVI et al., 1996; MANOR et al., 1999). Além disso, o Levantamento de Poliovírus Ambiental (EPS “*Environmental Poliovirus Surveillance*”) mostrou ser um método extremamente sensível em detectar uma amostra de poliovírus se apenas uma em cada 10.000 pessoas estiver excretando (HOVI et al., 2001). As propriedades de poliovírus isolados do meio ambiente refletem diretamente no tipo de vírus excretado após a imunização com a vacina pólio oral ou durante uma epidemia, especialmente porque os vírus excretados podem mudar gradualmente, durante a replicação no trato digestivo humano (WOOD & MACADAM, 1997), de atenuado a virulento, adquirindo as características de transmissão e neurovirulência do poliovírus selvagem (KEW et al., 2002).

Em 1996, um surto de poliomielite associado ao poliovírus tipo 1 selvagem, ocorreu na Albânia acometendo 145 pacientes, causando 87 casos de paralisia persistente e 16 mortes (FIORE et al., 1998). Durante o surto, quatro poliovírus isolados a partir de amostras de água do Rio Lana foram caracterizados pelo seqüenciamento parcial do genoma (5’NCR e VP1). O

resultado das análises das seqüências do isolado denominado Lana A demonstrou uma identidade de 96% com P2/Sabin enquanto o isolado denominado Lana B demonstrou ser um poliovírus recombinante intertípico entre P2/Sabin e P1 selvagem (região 5'NCR e VP1 respectivamente), ambos contendo mutação A<sub>481</sub>→G (DIVIZIA et al., 1999).

Portanto, a detecção de cVDPVs num ambiente como potencial causa de poliomielite deve dirigir a atenção especialmente quanto a taxa de cobertura vacinal e o número de indivíduos suscetíveis com aumentado risco de infecção (VINJÉ et al., 2004).

Durante a epidemia de cVDPVs na ilha caribenha de Hispanhola, o EPS foi implementado como complemento da investigação de AFP. Cinquenta e cinco amostras de água de rio e de esgoto foram coletadas quatro meses após o primeiro caso ter sido detectado na República Dominicana e durante o pico do surto. Dos 23 enterovírus isolados, 10 foram positivos para P1/Sabin 1, sete para P2/Sabin 2, cinco para o P3/Sabin e um isolado foi positivo tanto para o tipo 2 quanto o tipo 3. Devido ao surto ocorrido em Hispanhola estar associado com o tipo 1 cVDPV (KEW et al., 2002), a variabilidade genética das 10 cepas P1/Sabin foi investigada pela análise da seqüência nucleotídica da região de VP1. No total sete isolados foram relativamente próximos um dos outros (96,3% a 97,9% de identidade nucleotídica) em relação a amostra P1/Sabin e entre si (97% a 100% de identidade), entretanto, o relacionamento das seqüências foi substancialmente menor do que aquela normalmente observada (>99,5% de identidade nucleotídica) em isolados de AFP e VAPP. A análise da região 5'NCR revelou que todas os isolados possuíam as substituições G<sub>480</sub>→A e U<sub>525</sub>→C, apresentando valores de neurovirulência semelhantes que a cepa Mahoney (VINJÉ et al., 2004).

Em 2002, um poliovírus isolado PV3/EST/02/E252 (E252) foi isolado de amostra de água de esgoto na Estônia A caracterização preliminar do isolado E252 através de RT-PCR-RFLP revelou um perfil atípico de restrição em dos marcadores de RFLP. O isolado não foi reconhecido por nenhum dos antisoros no teste de imunoensaio. O seqüenciamento de VP1 mostrou 86,7% de identidade nucleotídica com a seqüência de P3/Sabin. A região 5'-NCR próxima a 3' terminal da região codificante de 2C foi relacionada a P3/Sabin enquanto o restante do genoma foi mais relacionado a P1/Sabin. A provável região de junção de recombinação de S3/S1 foi encontrada na região codificante de 2C. Múltiplas substituições nucleotídicas foram observadas ao longo do genoma, incluindo em todos os marcadores genéticos ligados a reversão a neurovirulência. O isolado E252 perdeu o seu fenótipo termo-sensível em células GMK e RD e foi capaz de se replicar em temperaturas elevadas assim como o P3/Leon (BLOMQUIST et al., 2004).

A análise virológica de amostras do meio ambiente é um método eficaz para a detecção da importação de poliovírus dentro de países onde o vírus não é endêmico. A pesquisa de

poliovírus a partir de amostras do meio ambiente foi implementada em Israel seguindo o último surto de poliomielite ocorrido no país em 1988 associado ao poliovírus tipo 1 selvagem. A ocorrência deste surto foi de extrema importância, pois ocorreu dentro de uma população com alta prevalência de anticorpos neutralizantes para o poliovírus tipo 1 e porque a maioria dos casos ocorreu em pessoas que receberam as três doses de OPV. Quatro poliovírus tipo 1 selvagem foram isolados a partir de amostras de esgoto (SHULMAN et al., 2000a). Durante o mesmo ano, outros 25 isolados RCT-positivos (capacidade reprodutiva a temperatura supra-ótima) foram coletados a partir de amostras de água de esgoto, dos quais 20 foram identificados como tipo 2 e 5 como sendo pertencentes ao tipo 3. A análise da seqüência nucleotídica da região P1 do genoma (codificante das quatro proteínas de capsídeo) de poliovírus tipo 2 isolado revelou, que esta diferia de P2/Sabin em 8,3% (220 de 2646) nucleotídeos, sendo sugerido que o vírus havia replicado por um período de seis anos desde a administração da dose inicial de OPV. As mutações G<sub>481</sub>→A da região 5'NCR e Iso<sub>143</sub>→Thr de VP1 foram encontradas no genoma do isolado, sendo altamente neurovirulento para camundongos transgênicos. Devido ao alto nível de cobertura vacinal em Israel, casos associados com o poliovírus tipo 2 neurovirulento deveriam ser presumivelmente raros. Entretanto é possível que a circulação do poliovírus tipo 2 possa ocorrer na ausência de casos de paralisia dentro de uma comunidade localizada com uma cobertura vacinal elevada (SHULMAN et al., 2000b).

No Japão, a investigação de poliovírus no ambiente, durante o período de 1993 a 1995, levou ao isolamento de 78 poliovírus isolados. Destas amostras, seis (três do tipo 2 e três do tipo 3) foram isolados de água do rio e 72 (16 do tipo 1, 28 do tipo 2, e 28 do tipo 3) foram isolados de águas de esgoto. Dos 78 isolados, a seqüência nucleotídica dos 36 isolados (quatro do tipo 1, 17 do tipo 2, e 15 do tipo 3) foram idênticas as cepas Sabin de referência. Os outros 42 isolados (dois do tipo 1, 14 do tipo 2, e 16 do tipo 3) foram VDPV com 1,4% de diferença nucleotídica) (MATSUURA et al., 2000).

A antigenicidade neutralizante e a neurovirulência de 13 amostras P1/Sabin isoladas de águas de esgoto no Japão demonstraram que nove amostras apresentaram fenótipo neurovirulento e que parte dos sítios antigênicos neutralizantes de cinco das nove amostras encontravam-se alterados. A análise das seqüências nucleotídeos de VP1 e de VP3 de três amostras dos 13 isolados foram idênticos a P1/Sabin. As outras 10 amostras apresentaram um dos seis pontos de mutação nestas regiões e foram identificadas como VDPV tendo menos de 1,4% de divergência nucleotídica de P1/Sabin (MATSUURA et al., 2000). Das 10 amostras variantes de vacina quatro foram virulentas apresentando as substituições A<sub>480</sub> e C<sub>525</sub> (HORIE et al., 2002).

Através do teste de MAPREC, 29 poliovírus tipo 3 VDPV e 25 poliovírus tipo 2 VDPV isolados coletados de água de rios e de esgoto no Japão foram caracterizados quanto ao nível de revertentes  $C_{472}$  e  $G_{482}$ , respectivamente. Do total de amostras P3/VPDV caracterizadas, 16 (55%) apresentaram a taxa de  $C_{472}$  entre 2% e 91%, enquanto o nível de revertentes  $G_{481}$  estimado dos 23 (92%) P2/VDPV foi de 44% a 96% (YOSHIDA et al., 2002; 2000).

## 2 RELEVÂNCIA

Os surtos de poliomielite nas ilhas de Hispanhola, Filipinas e Madagascar têm demonstrado que poliovírus derivados da vacina potencialmente neurovirulentos podem continuar a circular em regiões onde os poliovírus selvagens já haviam sido erradicados.

A pesquisa de paralisia flácida aguda (AFP) tem sido a principal estratégia para o sucesso dos esforços em alcançar a erradicação da poliomielite, entretanto, a habilidade dos vírus vacinais geneticamente mutados de circular por mais de dois anos antes do surgimento de casos da doença em áreas declaradas livres da pólio, enfatiza a importância de métodos alternativos de pesquisa na era pós-erradicação.

Ao nos aproximarmos da erradicação da poliomielite mundialmente a notificação de surtos causados por VDPVs levanta questões importantes quanto ao momento e o modo de interromper a vacinação contra os poliovírus após a certificação da erradicação de todos os poliovírus selvagens. É essencialmente importante determinar se a vacinação pode ser seguramente interrompida após a erradicação e, se então, como isto deveria ser realizado.

A pesquisa de poliovírus isolados a partir do meio ambiente, tanto em áreas livres da pólio como em regiões onde o poliovírus ainda é endêmico, poderia ser utilizada para detectar a presença de poliovírus sempre antes do surgimento de casos de poliomielite, estabelecer decisões para promover a pesquisa de AFP, procurar falhas na cobertura vacinal, identificar riscos de grupo, e por último, promover a imunização de crianças, deste modo, prevenindo, possivelmente, casos e surtos que poderiam ser inevitáveis.

Após a suspensão global da vacinação com OPV, a manutenção de uma rigorosa pesquisa da circulação de poliovírus deverá ser mantida por um futuro devido o risco da emergência de cVDPVs dentro de 3 a 5 anos em uma população não imunizada.

Portanto, o estudo relacionado à pesquisa de poliovírus no meio ambiente, objetivando a produção de dados sobre as características moleculares das cepas isoladas, tem importantes implicações para estratégias atuais e futuras da iniciativa de erradicação global da poliomielite da Organização Mundial da Saúde.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral caracterizar geneticamente o genoma de poliovírus isolados a partir de amostras ambientais.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o isolamento de poliovírus em amostras coletadas do meio ambiente.
- Comparar as seqüências de nucleotídeos obtidas com aquelas das amostras vacinais de referência, detectando mutações importantes para a reversão à neurovirulência dos poliovírus, através do seqüenciamento da região de 5'-NCR e do gene VP1.
- Observar os principais determinantes de atenuação presentes na região 5'-NCR e no gene VP1 do genoma dos poliovírus.
- Pesquisar a presença de amostras de poliovírus vacinais Sabin derivados.
- Pesquisar a existência de recombinações (intertípicas ou interespécies) nos genes 2C e 3D dos poliovírus isolados.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS AMBIENTAIS

Neste estudo foram analisadas 27 amostras de água de esgoto coletadas no Estado de São Paulo durante os anos de 1999, 2000 e 2001. As amostras foram processadas pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo) e enviadas ao Laboratório de Enterovírus do Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro para caracterização e identificação viral.

### 4.2 COLETA DAS AMOSTRAS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas quinzenalmente nos seguintes locais: Aeroporto de Cumbica, em Guarulhos, na cidade de Santos, no porto e no estaleiro da CODESP (Companhia de Docas do Estado de São Paulo), no porto de São Sebastião em São Sebastião, no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e, na Santa Casa de Misericórdia, ambos situados na cidade de São Paulo.

Esta coleta foi realizada através da técnica de Moore (mecha de gaze) conforme o protocolo da norma técnica CETESB/L5.505, que consiste na imersão de mechas de gaze hidrófila, arranjada em três dobras, durante 7 dias consecutivos em água de esgoto. As mechas foram acondicionadas em sacos plásticos e transferidas para béqueres de 500 ml, previamente identificados com os dados das amostras, contendo 100 ml de solução de extrato de carne a 3% durante 30 minutos. Após este período, a mecha de gaze foi torcida, de tal forma que todo o material aderido a essa mecha fosse retirado. Em seguida, o material retirado da mecha foi filtrado através da passagem por gaze dupla, fixada na parte superior de um novo béquer de 500 ml, com a finalidade de retirar resíduos grosseiros. Após a filtração, o pH foi ajustado para 3,5 com solução de HCL 6N e as amostras foram concentradas através de centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada. Logo após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 15 ml de solução de fosfato de sódio a 0,15M, pH 9,0 seguido por agitação durante 15 minutos. O pH foi ajustado para 7,0-7,2 e em seguida, foram procedidas as etapas de redução do efeito citotóxico e de descontaminação da amostra (CETESB, 2001).

#### **4.2.1** Redução dos efeitos citotóxicos dos concentrados finais das amostras de água de esgoto

Para a redução dos componentes tóxicos, os concentrados finais das amostras foram processados através de limpeza com Vertell XF e a descontaminação da amostra com filtros com membrana Zeta Plus 60S. O porta-filtro que contém a membrana Zeta Plus 60S foi acoplado em um recipiente estéril e a membrana tratada com água destilada e com 10 ml de soro fetal bovino a 10%, com auxílio de seringa hipodérmica e pressão manual. Em seguida, o porta filtro foi transferido para um recipiente estéril previamente rotulado com os dados da amostra e procedida a filtração da mesma, utilizando seringa hipodérmica e pressão manual. Após a filtração o filtro foi lavado com 2 ml de meio de Eagle com 10% de soro fetal bovino inativado, pH 9,0 (CETESB, 2001).

#### **4.2.2** **Eliminação de bactérias e fungos dos concentrados finais das amostras de água de esgoto e certificação da esterilidade**

Antes de ser inoculado em culturas de células, a amostra foi submetida ao teste de esterilidade quanto à presença de bactérias e fungos contaminantes. Este teste foi realizado em câmara de fluxo laminar vertical observando-se todas as medidas de assepsia. Em um tubo estéril, previamente rotulado com os dados da amostra, foi adicionado 0,3 ml de penicilina, 0,3 ml de sulfato de gentamicina, 0,3 ml de fungizona líquida (250 µg /ml) e a amostra teste. A mistura foi mantida sob homogeneização vigorosa e deixada em contato durante 1 hora à temperatura ambiente.

Após esse período, 1 ml da amostra teste foi inoculado em dois tubos de caldo de soja e triptona. Os tubos inoculados foram incubados em estufa a 37°C e leituras diárias durante 14 dias foram realizadas. Durante o período de leitura as amostras foram mantidas a -70°C. A amostra foi considerada livre de contaminantes se o caldo de soja e triptona não apresentaram turvação ou qualquer outra evidência de crescimento de microrganismos durante os 14 dias de incubação (CETESB, 2001).

#### **4.3** ISOLAMENTO VIRAL

As amostras foram inoculadas em células RD (células diplóides de rhabdomiosarcoma embrionário humano) e L20B (linhagem celular transgênica derivada de células L de

camundongo, que expressa receptores para os poliovírus). Dois sistemas foram utilizados: técnica de plaqueamento direto e inoculação em meio líquido. As amostras apresentando efeito citopático positivo ou placas de lise em uma das linhagens foram submetidas à identificação por reações de RT-PCR utilizando *primers* específicos para detecção do poliovírus (selvagem, Sabin 1, 2 e 3) e a soroneutralização com *pool* de Melnick (BULLETIN OF WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1973).

#### 4.4 PREPARAÇÃO DE ESTOQUE VIRAL

Com o objetivo de se obter um estoque viral para a realização das etapas posteriores do trabalho, as amostras de poliovírus isoladas foram inoculadas, em volumes de 0,2 ml, em monocamadas de células RD, fornecidas pelo CDC (*Center for Disease Control and Prevention*, Atlanta / Georgia - USA) ao Laboratório de Enterovírus da Fiocruz/RJ.

As células foram cultivadas em tubos transparentes para cultura de células, estéril, descartável de 15 mm x 160 mm em poliestireno. O volume do inóculo foi mantido em contato com a monocamada de células por 30 minutos, com tubos inclinados, para facilitar a adsorção viral. Após este tempo, adiciona-se 1,8 ml de meio de manutenção, constituído por meio MEM-Eagle Earle's contendo 2% de soro fetal bovino. Para cada grupo de amostras inoculadas, um controle de células (tubo não inoculado) foi incluído, servindo como padrão negativo. As culturas celulares inoculadas foram mantidas em estufa a 36°C e submetidas a leituras diárias, com auxílio de um microscópio invertido. Os tubos apresentando efeito citopatogênico (ECP) característico foram estocados a -20°C para posterior identificação (WHO, 2004).

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROVÍRUS POR RT-PCR

Para a confirmação da identidade dos isolados como pertencente ao gênero dos enterovirus, foi utilizada a técnica de transcrição reversa (RT-PCR). O par de iniciadores (ou *primers*) utilizados nas reações (EVR e EVF) flanqueiam a região terminal 5'-NCR (não codificante) do RNA, que é uma região conservada e comum ao genoma de todos os enterovírus humanos conhecidos. O tamanho do fragmento amplificado esperado é de 153 pb.

A seqüência do *primer* EVR (R – Reverse) é: **5'-att gtc acc ata agc agc c-3'** e a posição em que ele se complementa ao genoma é entre os nucleotídeos (nt) 599-581. Já a seqüência do *primer* EVF (F – Forward) é: **5'-ctc egg ccc ctg aat gcg gct a-3'** (nt 445-466). Este par de primers é utilizado na rotina do diagnóstico do Laboratório de Enterovírus (dados

não publicados). Foram aliqüotados 3 µl de suspensão viral, apresentando efeito citopático, em tubos tipo eppendorf de 0,2 ml e este conteúdo foi aquecido a 95°C por 3 minutos para a inativação viral. Após a inativação, foram acrescentados 5 µl de tampão para PCR 10X concentrado e 50 pmoles do *primer* R (EVR), e foi procedida uma etapa de desnaturação do RNA seguida de uma etapa de hibridização do primer, submetendo a mistura a 95°C por 5 minutos em um termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) e, em seguida, colocando-a em banho de gelo. A seguir, foram adicionados ao tubo 50 pmoles do *primer* F (EVF), 40 U de inibidor de RNase (*RNAasin*, Promega), 5 U de *Taq DNA Polimerase* (Life Technologies), 20 U de transcriptase reversa (*SuperScript II*, Life Technologies), 10 mM de mistura de dNTP's (100 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato - dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies), completando-se o volume para 25 µl com água deionizada autoclavada. A reação de transcrição reversa foi realizada a 42°C por 20 minutos e 95°C por 3 minutos, seguida por 33 ciclos de 95°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos e 70°C por 45 segundos em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems).

A manipulação das amostras e o preparo das misturas de enzimas e reagentes utilizados na RT-PCR foram realizados em ambientes distintos, a fim de evitar contaminação cruzada.

#### 4.6 CONFIRMAÇÃO DOS ISOLADOS COMO POLIOVÍRUS

Após a confirmação de que a amostra isolada pertencia ao gênero Enterovírus, uma nova reação de RT-PCR foi realizada com o objetivo de identificar se as amostras enterovírus positivas eram poliovírus. As amostras positivas foram submetidas a duas novas reações visando à identificação do sorotipo e se eram de origem vacinal ou selvagem.

A seqüência do *primer* PANPVR (R – *Reverse*) é: **5'-tti aii jcr tgi ccr ttr tt-3'** e a seqüência do *primer* PANPVF (F – *Forward*) é: **5'-cit ait cin git tyg aya tg-3'** (KILPATRICK et al., 1996) (I= Inosina; Y = C / T; W = A / T; M = A / C; R = A / G; N = A / C / G / T).

Foram aliqüotados 3 µl da suspensão celular, apresentando efeito citopático, em tubo do tipo eppendorf de 0,2 ml e inativados por aquecimento a 95°C durante 3 minutos. Logo após, foi acrescentado tampão para PCR 10X concentrado e 50 pmoles do *primer* R (PANPVR). A mistura foi aquecida a 95°C por 5 minutos em um termociclador *GeneAmp®*

*PCR System 9700* (Applied Biosystems) para o desenovelamento do RNA. Em seguida, o tubo foi colocado em um banho de gelo e depois centrifugado brevemente, para ser adicionado 50 pmoles do *primer* F (PANPVF), 40 U de inibidor de RNase (*RNAsin*, Promega), 5 U de *Taq DNA Polimerase* (Life Technologies), 20 U de transcriptase reversa (*SuperScript II*, Life Technologies), 10 mM de mistura de dNTP's (100 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato - dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies), completando-se o volume para 25 µl com água deionizada autoclavada. A transcrição reversa foi realizada a 42°C por 30 minutos 95°C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos das seguintes etapas: 94°C por 45 segundos, 42°C por 45 segundos e 60°C por 45 segundos em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems).

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DO SOROTIPO DE POLIOVÍRUS ATRAVÉS DE RT-PCR

Após a confirmação de que a amostra isolada pertencia ao gênero Poliovírus os isolados foram submetidos a uma nova reação de RT-PCR para determinação do seu sorotipo.

A seqüência do *primer* PANPV1R (R – Reverse) é: **5'-atc ati cty tci arc aty tg-3'** e A seqüência do *primer* PANPV1F (F – Forward) é: **5'-tgc gig aya cia cic aya t-3'**. A seqüência do *primer* PANPV2R (R – Reverse) é: **5'-ayi ccy tci aci rci ccy tc-3'** e a seqüência do *primer* PANPV2F (F – Forward) é: **5'-tgc gig aya cia cic aya t-3'**. A seqüência do *primer* PANPV3R (R – Reverse) é: **5'-cci aiy tgi ter tti gyr tc-3'** e a seqüência do *primer* PANPV3F (F – Forward) é: **5'-aay cci tci rti tty tay ac-3'** (KILPATRICK et al., 1998) (I= Inosina; Y = C / T; W = A / T; M = A / C; R = A / G; N = A / C / G / T).

Para cada suspensão celular, foram aliqüotados 3 µl em 3 tubos eppendorf de 0,2 ml, e este conteúdo foi aquecido a 95°C por 3 minutos para a inativação viral e colocados em gelo para um rápido resfriamento. Após a inativação, foram acrescentados 19 µl do PANPV1 *primer* + buffer A no primeiro tubo, 19 µl de PANPV2 *primer* + buffer A no segundo, e 19 µl de PANPV3 *primer* + buffer A no terceiro. Os primers degenerados PANPV sorotipos 1, 2 e 3 flanqueiam a região VP1 do genoma do poliovírus amplificando segmentos com tamanhos de 70, 79 e 140 pb respectivamente.

A seguir a mistura foi aquecida a 95°C por 5 minutos em um termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) para o desenovelamento do RNA. Em seguida, cada tubo foi colocado em um banho de gelo e depois centrifugado brevemente, para

ser adicionado 5 µl do buffer B contendo enzimas (0,7 µl de DTT à 1M, 6,9 µl de inibidor de RNase (*RNAasin*, Promega) à 40 U/µl, 3,6 µl de transcriptase reversa (*AMV- RT*, Invitrogen) à 25 U/µl e 13,7 µl de *Taq DNA Polimerase* (Life Technologies) à 5 U/µl). A reação de transcrição reversa foi realizada a 42°C por 30 minutos 95° C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos das seguintes etapas: 94°C por 45 segundos, 42°C por 45 segundos e 60°C por 45 segundos em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems).

A manipulação das amostras e o preparo das misturas de enzimas e reagentes utilizados na RT-PCR foram realizados em ambientes distintos, a fim de evitar contaminação cruzada.

#### 4.8 DIFERENCIAÇÃO INTRATÍPICA DOS POLIOVÍRUS ISOLADOS

Após a identificação do sorotipo de cada amostra, foi pesquisada a origem da cepa quanto a sua origem, se vacinal ou selvagem. Essa reação é feita através de PCR multiplex contendo três pares de primers específicos para cada sorotipo vacinal. A determinação da origem do vírus como sendo vacinal ou selvagem foi realizada pela interpretação do resultado desta reação, ou seja, amostras positivas são de origem vacinal e as negativas de origem selvagem.

A seqüência do *primer* PV1SabinR (R – Reverse) é: **5'-tcc act ggc ttc agt gtt-3'** e a seqüência do *primer* PV1SabinF (F – Forward) é: **5'-agg tca gat gct tga aag c-3'**. A seqüência do *primer* PV2SabinR (R – Reverse) é: **5'-cgg ctt tgt gtc agg c-3'** e a seqüência do *primer* PV2SabinF (F – Forward) é: **5'-ccg ttg aag gga tta cta aa-3'**. A seqüência do *primer* PV3SabinR (R – Reverse) é: **5'-agt atc agg taa gct atc c-3'** e a seqüência do *primer* PV3SabinF (F – Forward) é: **5'-agg gcg ccc taa ctt tg-3'** (YANG et al., 1991).

Em um único tubo 3 µL da suspensão celular foram aliqüotados em tubo eppendorf de 0,2 ml, seguido de inativação por aquecimento a 95°C durante 3 minutos e colocados em gelo para um rápido resfriamento. Em seguida, foram acrescentados 19 µl de PV1Sabin *primer* + buffer A, PV2Sabin *primer* + buffer A e PV3Sabin *primer* + buffer A). Estes oliogonucleotídeos flanqueiam a região VP1 do genoma do poliovírus amplificando segmentos com tamanhos de 97, 71 e 53 pb, respectivamente.

A mistura foi aquecida a 95°C por 5 minutos em um termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) para o desenovelamento do RNA. Em seguida, o tubo foi colocado em um banho de gelo e depois centrifugado brevemente, para ser adicionado 5 µl do buffer B acrescido de enzimas (0,7 µl de DTT à 1M, 6,9 µl de inibidor de RNase (*RNAasin*,

Promega) à 40 U/μl, 3,6 μl de transcriptase reversa (*AMV-RT*, Invitrogen) à 25 U/μl e 13,7 μl de *Taq DNA Polimerase* (Life Technologies) à 5 U/μl). A reação de transcrição reversa foi realizada a 42°C por 20 minutos e 95°C por 3 minutos, seguida por 33 ciclos das seguintes etapas: 95°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos e 70°C por 45 segundos em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems).

#### 4.9 CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DOS POLIOVÍRUS ISOLADOS

##### 4.9.1 Extração do RNA viral

As amostras de poliovírus foram submetidas à extração de RNA com o uso do reagente *Trizol® LS* (Life Technologies), de acordo com o protocolo sugerido do fabricante. Este método baseia-se na desnaturação de proteínas e precipitação sequencial de ácidos nucleicos contidos no meio através do fenol, na presença de sais de guanidina, que é um inibidor da enzima RNase. Para esta técnica, 250 μl da suspensão celular, apresentando 4+ (++++) ECP (efeito citopático), foram adicionados em 750 μl de *Trizol® LS*. A mistura foi agitada por 2 minutos em um agitador tipo vórtex e incubada à temperatura ambiente durante 5 minutos para destruição do capsídeo e liberação do RNA. Foram adicionados 200 μl de clorofórmio, os tubos foram homogeneizados vigorosamente no vórtex por 15 segundos e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos a 8°C. O RNA presente na fase aquosa, perfazendo um volume de aproximadamente 70% do volume de *Trizol® LS* utilizado inicialmente (~500 μl), foi cuidadosamente transferido para um novo tubo e o RNA foi, então precipitado com 500 μl de álcool isopropílico agitando-se vigorosamente e incubando por 40 minutos à temperatura de – 20 °C. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 20 minutos a 8°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado, contendo o RNA, foi lavado adicionando-se 1000 μl de etanol 75%, agitando o tubo e centrifugando por 10 minutos a 14.000 rpm a 8°C. Após este período, o sobrenadante foi desprezado, e a lavagem foi repetida, desta vez adicionando-se etanol absoluto, com centrifugação após a lavagem, de 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado.

O precipitado, então, foi seco em um termobloco a 60°C e ressuspenso em 9 μl de água deionizada estéril para ser utilizado para na síntese do cDNA.

#### 4.9.2 Síntese de cDNA

Nesta etapa o RNA extraído a partir da suspensão celular foi transcrito em cDNA de acordo com a seguinte reação: Em um tubo de 0,5 ml foram adicionados o RNA extraído e ressuspenso em 9 µl água deionizada autoclavada e 100 pmoles de *Oligo dT* (Promega). O tubo foi homogeneizado e a mistura foi incubada a 70°C por 10 minutos. Em seguida, o tubo contendo a mistura foi levado para um banho de gelo e em seguida centrifugado rapidamente. Foram adicionados 4 µl de *5X first strand buffer cDNA* (Invitrogen), 0,1M, de DTT, 10 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato – dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Invitrogen), 40 U de *RNasin* (Promega), completando-se o volume para 9 µl com água deionizada autoclavada. O tubo foi homogeneizado e a mistura foi incubada a 42°C por 2 minutos. Finalmente, foram adicionados 20 U de transcriptase reversa (*Superscript II*, Invitrogen), resultando em um volume final de 20 µl. A reação foi submetida à nova incubação a 42°C por 50 minutos. As amostras de cDNA obtidas foram estocadas à -20°C até seu uso nas reações de RT-PCR. Todas as incubações da síntese de cDNA foram feitas em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems).

#### 4.9.3 Reação de RT-PCR para amplificação da região 5'-NCR do genoma dos poliovírus

A amplificação da região 5'-NCR foi realizada utilizando-se 3 µl das amostras de cDNA obtidas nas reações acima, tampão de PCR 10X concentrado [200 mM Tri-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, 1,5 ml de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM], 50 pmoles do *primer* anti-senso (EVR) e 100 pmoles do *primer* senso (S11S) direcionados para os dois extremos da região, 10 mM de mistura de cada dNTP's (Invitrogen), 5 U/µl de *Taq DNA polimerase* (Invitrogen) e, completando-se o volume para 50 µl com água deionizada autoclavada. A mistura foi submetida a 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 40 segundos e 70°C por 1 minuto e um período de extensão final de 5 minutos a 72°C em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems).

A seqüência do *primer* EVR (R – Reverse) é: **5'-att gtc acc ata agc agc c-3'** (nt 599-581) e a seqüência do *primer* S11S (F – Forward) é: **5'-tat agg tta aaa cag ctc tgg ggt tg-3'** (nt 01-20).

Para evitar contaminação entre as amostras e os produtos amplificados, a extração do RNA viral e o preparo das misturas de enzimas e reagentes utilizados na síntese do cDNA e na PCR foram feitos em ambientes distintos.

#### 4.9.4 Reação de RT-PCR para amplificação do gene VP1 do genoma dos poliovírus

A amplificação do gene da proteína de capsídeo VP1 foi realizada da seguinte forma: utilizaram-se 3 µL das amostras de cDNA obtidas, tampão de PCR 10X concentrado [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, 1,5 ml de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM], 10 pmoles do *primer* anti-senso (Q8) e 10 pmoles do *primer* senso (Y7) direcionados para os dois extremos do gene da proteína, 10 mM de mistura de cada dNTP's (Invitrogen), 5 U/µl da enzima *Taq DNA polimerase* (Invitrogen), e completando-se o volume para 50 µl com água deionizada autoclavada. A mistura foi submetida a 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 42°C por segundos e 60°C por 30 segundos, finalizando-se com um período final de extensão à 72°C por 5 minutos em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems).

a seqüência do *primer* Q8 (R – *Reverse*) é: **5'-acy aag agg tct cta ttc cac-3'**. A posição em que ele se complementa ao genoma é entre os nucleotídeos 3504-3483, e a seqüência do *primer* Y7 (f – *Forward*) é: **5'-ttt gtg tca gcc tgt aat gac-3'** (nt 2402-2422).

#### 4.9.5 - Reação de RT-PCR para amplificação da região 2C e 3D do genoma dos poliovírus

Foram realizadas reações de PCR utilizando-se *primers* recombinantes específicos para o sorotipo, visando o reconhecimento de regiões de recombinação nas regiões 2C, e 3D do genoma.

Para cada reação de PCR foram utilizados 0,5 µl das amostras de cDNA obtidas, tampão de PCR 10X concentrado [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, 1,5 ml de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM], 10 pmoles de cada *primer* (REC-*primer* 1, 2 e 3), 10 mM de mistura de dNTP's (Invitrogen), 5 U/µl da enzima *Taq DNA polimerase* (Invitrogen) e, completando o volume para 25 µl de água deionizada autoclavada. A mistura foi submetida a 32 ciclos de 95°C por 45 segundos, 50°C por 1 minuto e 65°C, finalizando-se com um período de extensão final à 72°C por 5 minutos em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems).

Estes nucleotídeos ligam-se especificamente a segmentos das porções 2C e 3D do RNA viral amplificando segmentos de 199 pb e 226 pb (S1-REC), 189 pb e 225 pb (S2-REC) e 199 pb e 228 pb (S3-REC) respectivamente (KILPATRICK et al., 2004).

A seqüência do *primer* S1-REC 321 (R - *Reverse*) para a região 2C é: **5'-tat gta gtt gtt aat ggt atg-3'** (nt 4482-4462) e a seqüência do *primer* 281 (F - *Forward*) é: **5'-tgt aac aaa act tag aca ac-3'** (nt 4284-4303). A seqüência do *primer* S1-REC 288 (R - *Reverse*) para a região 3D é: **5'-atc gca ccc tac tgc tga-3'** (nt 6648-6631) e a seqüência do *primer* 287 (F - *Forward*) é: **5'-taa gga aat gca aaa act gc-3'** (nt 6423-6442).

A seqüência do *primer* S2-REC 284 (R - *Reverse*) para a região 2C é: **5'-tgg ata gat agc cac cgc-3'** (nt 4412-4395) e a seqüência do *primer* 283 (F - *Forward*) é: **5'-caa att cat tag ttg gtt gc-3'** (nt 4224-4243). A seqüência do *primer* S2-REC 302 (R - *Reverse*) para a região 3D é: **5'-gga tca caa cca act gca ct-3'** (nt 6649-6630) e a seqüência do *primer* 300 (F - *Forward*) é: **5'-agg aaa tgc gga gac tct ta -3'** (nt 6425-6444).

A seqüência do *primer* S3-REC 322 (R - *Reverse*) para a região 2C é: **5'-tat gta att att aat ggt gtg-3'** (nt 4482-4462) e a seqüência do *primer* 320 (F - *Forward*) é: **5'-tgt aac caa att gaa aca gt-3'** (nt 4284-4303). A seqüência do *primer* S3-REC 318 (R - *Reverse*) para a região 3D é: **5'-gga tgc cat cca act gca ct-3'** (nt 6650-6671) e a seqüência do *primer* 319 (F - *Forward*) é: **5'-caa aga aat gca aag act tt-3'** (nt 6423-6442).

#### 4.9.6 Visualização dos produtos amplificados

##### 4.9.6.1 Gel de Acrilamida

Para visualização dos produtos amplificados na RT-PCR, 10 µl do produto amplificado foram misturados a 4 µl de tampão da amostra (*Loading buffer 6X*) e a mistura foi aplicada em um gel de acrilamida 10%. Foi utilizado como referência de tamanho molecular, o marcador *50 bp* (Invitrogen). A corrida de eletroforese foi realizada a uma corrente de 200 Volts em tampão TBE 0,5X por 30 a 40 minutos e, em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,1 µg/ml). Os produtos da amplificação foram visualizados em um transiluminador de ultravioleta e os resultados fotografados com filme Polaroid 667.

#### 4.9.6.2 Gel de Agarose

Para visualização dos produtos amplificados de 1100 pb correspondentes ao gene da proteína VP1, 50 µl do produto amplificado foram misturados a 8 µl de tampão da amostra (*Loading buffer 6X*) e a mistura foi aplicada em um gel de agarose 1%. Foi utilizado como referência de tamanho molecular, o marcador 100 bp (Invitrogen). A corrida de eletroforese foi realizada a uma corrente de 120 Volts em tampão TAE 1X por 30 a 40 minutos e, em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,1 µg/ml). Os produtos da amplificação foram visualizados em um transiluminador de ultravioleta e os resultados fotografados com filme Polaroid 667.

#### 4.9.7 Purificação dos produtos de RT-PCR

Os produtos de amplificação foram purificados utilizando-se o kit comercial *QIAquick® Gel Extraction* (Qiagen), seguindo-se o protocolo do fabricante, com algumas modificações. As amostras de RT-PCR para o gene da proteína VP1 e da região 5'-NCR foram eluídos em gel de agarose 1%. As bandas de interesse (1100 pb e 700 pb) foram excisadas dos géis com ajuda de um bisturi, pesadas e transferidas para tubos de 1,5 ml.

Foram adicionados aos tubos tampão de solubilização QG, na proporção de 300 µl de tampão QG / 100 mg de gel). Os tubos foram incubados por 10 minutos a 50°C em termobloco, com homogeneizações a cada 3 minutos para garantir a solubilização do gel. Após total solubilização, a cor da mistura foi verificada para garantir que o pH estivesse menor que 7,5. O gel integralmente dissolvido foi transferido para colunas dispostas sobre tubos coletores de 2,0 ml, e esses tubos foram centrifugados por 1 minuto a 13.200 rpm. O filtrado foi descartado em frasco exclusivo para o descarte de tampão QG. Foram adicionados mais 500 µl de tampão QG para remover todo o resíduo da agarose, e os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 13.200 rpm e o filtrado descartado novamente. O procedimento baseia-se na capacidade de ligação do DNA na coluna, pela qual a amostra passa durante o procedimento de purificação. Após a retenção do DNA na coluna, foram adicionados 750 µl de tampão de lavagem PE, seguido de centrifugação a 13.200 rpm por 1 minuto, e o filtrado descartado. Para garantir que todo resíduo de etanol do tampão PE fosse removido, a coluna foi novamente centrifugada e a mesma colocada em um tubo de 1,5 ml estéril e identificado. Para a eluição do DNA, agora purificado, foram realizadas duas etapas de lavagem, a primeira adicionando-se 50 µl de tampão EB no centro da coluna e centrifugando a 13.200 rpm por 1 minuto e a segunda, adicionando-se 30 µl de tampão EB, incubando por 1 minuto à

temperatura ambiente e novamente centrifugando a 13.200 rpm por 1 minuto. A coluna foi descartada e o filtrado estocado à -20 °C.

#### 4.9.8 **Avaliação quantitativa dos produtos de PCR purificados**

Uma alíquota de 4 µl do DNA purificado foi misturada com 2 µl de *Loading buffer 6X* e 6 µl de água deionizada autoclavada foi aplicada em gel de agarose 1% preparado com tampão TAE 1X corado com brometo de etídio (1,8 µl da solução estoque a 10 mg/ml). A intensidade da banda de cada produto foi avaliada por comparação com um padrão de marcador de massa molecular *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) indicando a concentração de DNA contida em cada amostra.

A corrida eletroforética foi realizada a 120 Volts por 40 minutos e o gel foi levado ao transiluminador de ultravioleta e os resultados fotografados com filme Polaroid 667.

#### 4.9.9 **Seqüenciamento dos produtos de RT-PCR**

Para esta reação foi utilizado o kit comercial “*ABI BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1*” (PE Applied Biosystems) de acordo com o protocolo do fabricante. O fundamento do método de seqüenciamento do kit utilizado é baseado na marcação fluorescente dos dideoxynucleotídeo (ddNTP's) incorporados às cadeias de DNA, de tamanhos variáveis formados durante os ciclos de desnaturação, anelamento e extensão.

O volume final de cada reação foi de 20 µl, contendo os seguintes componentes: DNA purificado a ser seqüenciado (na concentração de 140 ng); 10 pmoles do *primer* reverso Q8 ou do *primer* senso Y7 (utilizados separadamente em cada um dos tubos) para a proteína VP1; 5 pmoles do *primer* reverso EVR para a região 5'-NCR; 6,4 µl do tampão de seqüenciamento *Big Dye<sup>®</sup> terminator 5X sequencing buffer* (Taq DNA Polimerase, dNTP's, ddNTP's marcados, MgCl<sub>2</sub> e Tris-HCl pH 9,0) e 1,6 µl de tampão *Big Dye<sup>®</sup> terminator v3.1 cycle sequencing* ambos fornecidos pelo kit. A reação foi processada em termociclador *GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700* (Applied Biosystems) com 30 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 42 °C por 20 segundos e 60 °C por 1 minuto.

#### 4.9.10 **Purificação dos produtos de *Cycle Sequencing***

Os produtos de extensão obtidos nas reações de *cycle-sequencing* foram purificados por precipitação com etanol (Merck, Germany). Os produtos foram transferidos para tubos de 1,5 ml contendo 20 µl de água estéril e 60 µl de isopropanol absoluto (Merck, Germany). Os tubos foram brevemente agitados (em vórtex) e deixados em repouso por 15 minutos para a precipitação do produto. Em seguida, foram centrifugados por 20 minutos a 13.200 rpm. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 250 µl de isopropanol a 75%, vortexando rapidamente os tubos e centrifugando novamente, por 5 minutos a 13.200 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o conteúdo dos tubos foi completamente seco sob pressão negativa em aparelho *SVC 100 Speed Vac* (Savant Instruments) para posterior análise.

#### 4.9.11 **Análise das seqüências obtidas nas reações de *Cycle Sequencing***

As amostras secas foram ressuspensas em 20 µl de tampão TSR (*Template Supression Reagent* – Applied Biosystems) e aquecidas em termobloco a 95°C por 3 minutos para desnaturação, evitando a formação de estruturas secundárias. As amostras foram imediatamente colocadas em banho de gelo até o momento de serem analisadas.

As seqüências nucleotídicas obtidas foram analisadas em seqüenciador automático *PE 310 Genetic Analyser*, gerando eletroferogramas característicos.

#### 4.9.12 **Programas utilizados para análise das seqüências**

As seqüências obtidas foram editadas utilizando o programa Bio Edit versão 7.0 (HALL, 1999) e posteriormente comparadas com seqüências já depositadas no banco de dados contido no *Gene Bank* através do programa Blast, para confirmação da identidade viral e do sorotipo (ALTSCHUL et al., 1990).

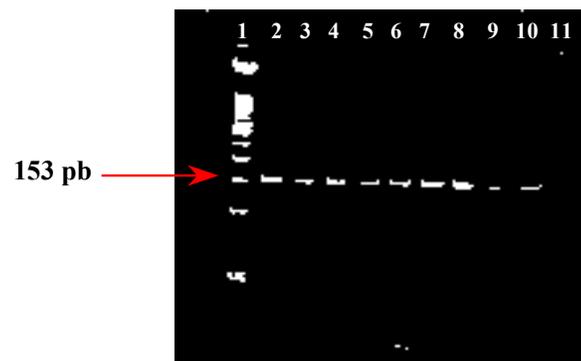
## 5 RESULTADOS

### 5.1 PROPAGAÇÃO DOS ISOLADOS EM CULTURA CELULAR

Todos os 27 isolados, provenientes de amostras de água de esgoto coletadas pela CETESB no Estado de São Paulo durante os anos de 1999, 2000 e 2001, puderam ser propagados em cultura de células RD e L20B, apresentando efeito citopático característico.

### 5.2 IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROVÍRUS ISOLADOS POR RT-PCR

A reação de RT-PCR foi procedida para confirmar o resultado do isolamento viral e para confirmar se o vírus isolado pertencia ao grupo enterovírus (PCR-GRUPO). As 27 amostras de virais propagadas em células RD foram também positivas por RT-PCR. Fragmentos com tamanho molecular esperado (153 pb), para o par de *primers* utilizado (EVR e EVF), foram obtidos (Figura 11).

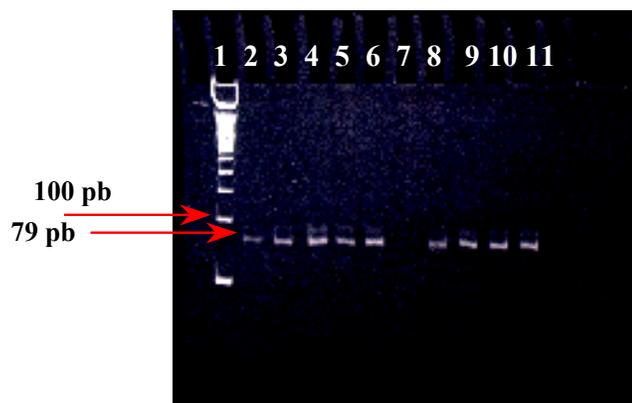


**Figura 11: Perfil eletroforético, em gel de acrilamida 1%, dos produtos amplificados, por reação de PCR, utilizando o par de *primers* EVR e EVF (153pb). Linha 1: Padrão de tamanho molecular 50 bp Low Mass DNA Ladder (Invitrogen). Linhas 2-9: amostras positivas; Linha 10: controle positivo.**

### 5.3 CONFIRMAÇÃO DOS ISOLADOS COMO POLIOVÍRUS

Após a confirmação de que as amostras isoladas pertenciam ao grupo enterovírus, nova reação RT-PCR foi realizada com o objetivo de identificar se os isolados enterovírus positivos eram poliovírus (PCR-PAN). Todos os 27 isolados, PCR-GRUPO positivos, foram PCR-PAN

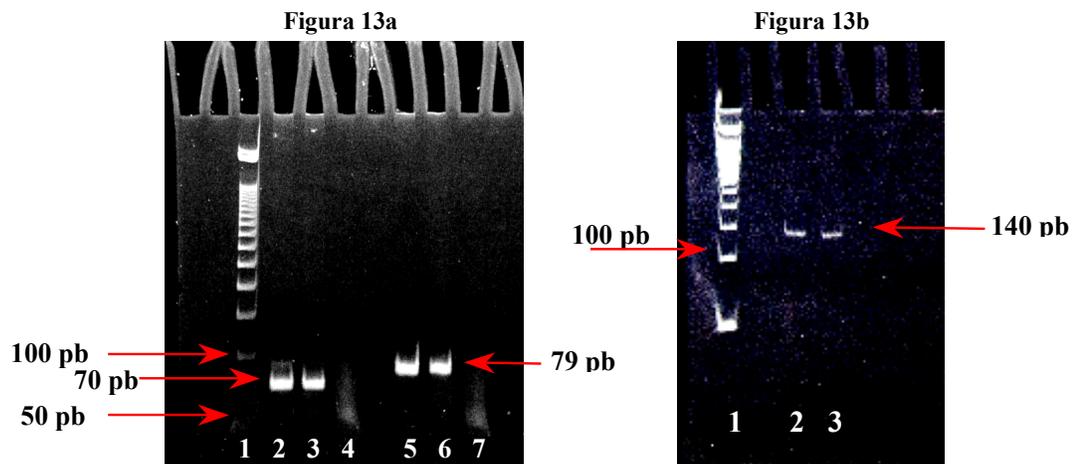
positivos. Fragmentos de 79 pb, que é o esperado para o par de *primers* utilizado (PANPVR e PANPVF), foram obtidos (Figura 12).



**Figura 12: Perfil eletroforético, em gel de acrilamida 1%, dos produtos amplificados, por reação de PCR, utilizando o par de *primers* PANPVR e PANPVF (79pb).** Linha 1: Padrão de tamanho molecular 50 bp *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen). Linhas 2-6: amostras positivas; 7: amostra negativa; 8-10; amostras positivas, 11: controle positivo.

#### 5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS DE POLIOVÍRUS POR RT-PCR

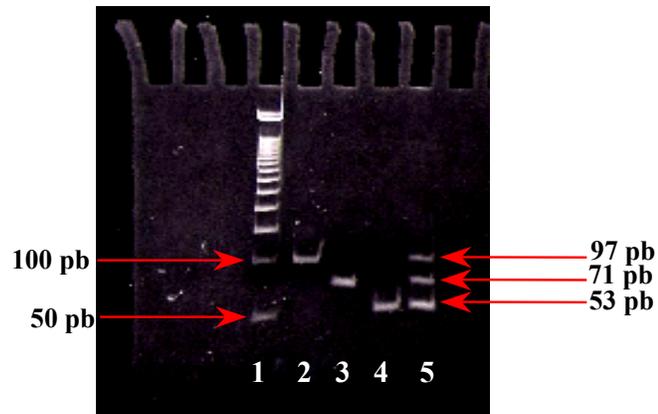
Após a confirmação de que os isolados pertenciam ao gênero *Poliovirus*, os mesmos foram submetidos à nova reação de RT-PCR para determinação do seu sorotipo (PCR-PV). Os seguintes sorotipos de poliovírus foram identificados: 5 poliovírus do sorotipo 1, 20 poliovírus do sorotipo 2 e 2 poliovírus do sorotipo 3. Fragmentos de 70, 79 e 140 pb, respectivamente, os quais são esperados para os pares de *primers* utilizados (PANPVR1, 2 e 3 e PANPVF1, 2 e 3), foram obtidos (Figura 13).



**Figura 13: Perfil eletroforético, em gel de acrilamida 1%, dos produtos amplificados, por reação de PCR, utilizando os pares de *primers* PANPVR 1, 2 e 3 e PANPVF 1, 2 e 3.** Figura 13a: Linha 1: Padrão de tamanho molecular 50 *bp* *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen). Linha 2: amostra positiva (PV1); 3: controle positivo (PV1); 4: controle negativo, 5: amostra positiva (PV2); 6: controle positivo (PV2); 7: controle negativo. Figura 13b; Linha 1: Padrão de tamanho molecular 50 *bp* *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen). Linha 2: amostra positiva (PV3); 3: controle positivo (PV3).

### 5.5 MULTIPLEX RT-PCR PARA A DIFERENCIAÇÃO INTRATÍPICA DOS POLIOVÍRUS IDENTIFICADOS

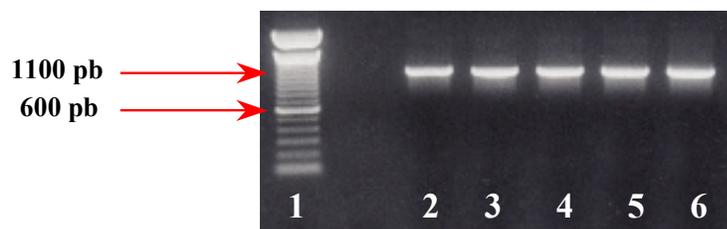
Após a identificação do sorotipo de cada amostra (item anterior), foi pesquisada a origem do isolado quanto a ser vacinal (PCR-Sabin) ou selvagem. Todos os 27 poliovírus isolados (5 PV tipo 1, 20 PV tipo 2 e 2 PV tipo 3) foram identificados como sendo de origem vacinal (PCR-Sabin positivos). Fragmentos de 97, 71 e 53 pb, os quais são os esperados para os pares de *primers* utilizados (PVSabinR 1, 2 e 3 e PVSabinF 1, 2 e 3), respectivamente, foram obtidos (Figura 14)



**Figura 14:** Perfil eletroforético, em gel de acrilamida 1%, dos produtos amplificados, por reação de PCR, utilizando os pares de *primers* PVSabinR1, 2 e 3 e PVSabinF1, 2 e 3. Linha 1: Padrão de tamanho molecular 50 *bp* *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen). Linha 2: amostra positiva (Sabin1); 3: amostra positiva (Sabin2); 4: amostra positiva (Sabin3); 5: controles positivos (Sabin1, 2 e 3).

## 5.6 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO VP1 DO GENOMA DOS POLIOVÍRUS ISOLADOS

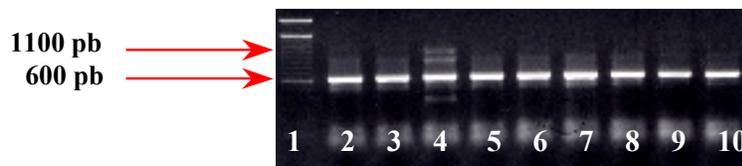
Após a propagação do isolado em culturas de células, o RNA genômico foi extraído, e o gene VP1, o qual codifica a principal proteína do capsídeo, do poliovírus foi amplificado pela técnica de RT-PCR, utilizando-se o par de *primers* Q8 e Y7. Todos os 27 isolados mostraram um produto de PCR com tamanho característico de 1100 pb, após realização da eletroforese em gel de agarose 1% e coloração com solução de brometo de etídeo (**Figura 15**).



**Figura 15:** Perfil eletroforético, em gel de agarose 1%, dos produtos amplificados, por reação de PCR, utilizando o par de *primers* Q8 e Y7 (1100 pb). Linha 1: Padrão de peso molecular 100 *bp* *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen). Linhas 2-6: amplificação do fragmento VP1 de poliovírus por RT-PCR (1100 pb).

## 5.7 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 5'-NCR DO GENOMA DOS POLIOVÍRUS ISOLADOS

A região da 5'-NCR do poliovírus foi amplificada pela técnica de RT-PCR, utilizando o par de *primers* EVR e S11S. Todos os 27 isolados demonstraram um produto amplificação de tamanho característico de 700 pb, após realização da eletroforese em gel de agarose 1% e coloração com solução de brometo de etídeo (Figura 16).

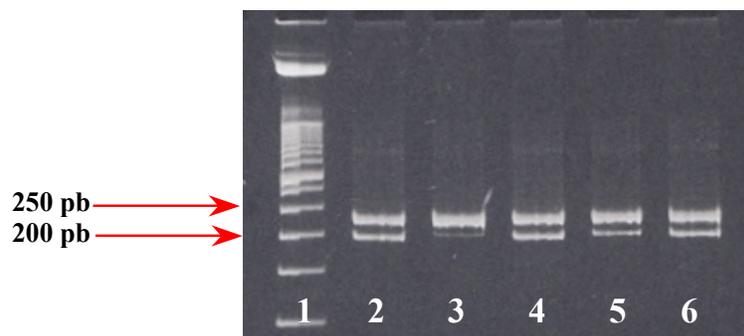


**Figura 16: Perfil eletroforético, em gel de agarose 1%, dos produtos amplificados, por PCR, utilizando o par de *primers* EVR e S11S.** Linha 1: Padrão de tamanho molecular 100 *bp* *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen). Linhas 2-10: amplificação do fragmento da região 5'-NCR de poliovírus por RT-PCR (700 pb).

## 5.8 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 2C E 3D DO GENOMA DOS POLIOVÍRUS TIPO 1

Como todos os cVDPVs identificados até o momento apresentavam seqüências recombinantes, conjuntos de *primers* para cepas Sabin recombinantes (SAB-REC) foram desenvolvidos como um método alternativo para a pesquisa de VDPVs. Isolados não recombinantes e vacina/não vacina recombinantes podem ser identificados de pelo padrão de reatividade com os *primers* SAB-REC. Quando os *primers* SAB-REC são utilizados os isolados relacionados à vacina geram produtos de amplificação específicos, pois este conjunto de *primers* especificamente amplifica as seqüências que correspondem às cepas Sabin de referência (KILPATRICK et al., 2004).

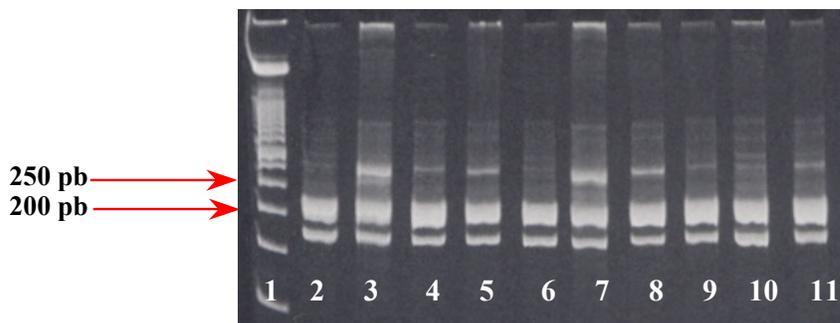
Fragmentos das regiões 2C e 3D do poliovírus tipo 1 foram amplificados, por RT-PCR, utilizando o par de *primer* S1-REC. Todas as 5 amostras poliovírus tipo 1 mostraram perfil característico com produtos de amplificação de tamanho esperado (2C – 199 pb e 3D – 226 pb), após realização da eletroforese em gel de agarose 1% e coloração com solução de brometo de etídeo (Figura 17). Nenhuma amostra mostrou ser recombinante nas regiões 2C e 3D do genoma.



**Figura 17: Perfil eletroforético, em gel de poliacrilamida, dos produtos amplificados, por PCR, utilizando *REC-primer* S1-REC.** Linha 1: Padrão de tamanho molecular 50 *bp* *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen). Linhas 2-6: amplificação do fragmento da região 2C (199 pb) e 3D (226 pb) do poliovírus tipo 1 por RT-PCR.

## 5.9 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 2C E 3D DO GENOMA DE POLIOVÍRUS TIPO 2

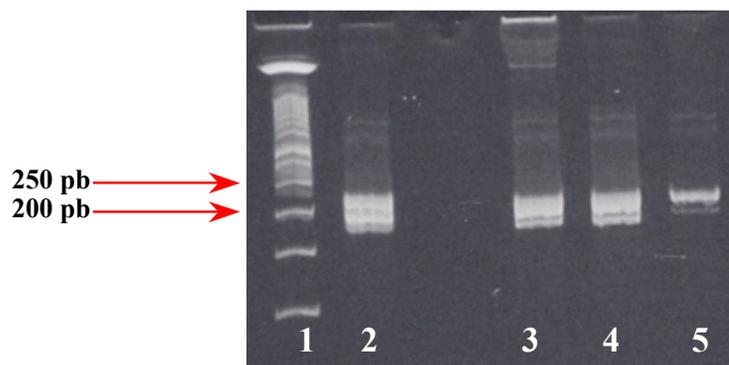
Fragmentos das regiões 2C e 3D do poliovírus tipo 2 foram amplificados pela técnica de RT-PCR, utilizando o par de *primers* S2-REC. Todas as 20 amostras poliovírus tipo 2 mostraram os produtos de amplificação com o tamanho característico (2C – 189 pb e 3D – 225 pb), após realização da eletroforese em gel de agarose 1% e coloração com solução de brometo de etídeo (Figura 18). Nenhuma amostra mostrou ser recombinante nas regiões 2C e 3D do genoma.



**Figura 18: Perfil eletroforético, em gel de poliacrilamida, dos produtos amplificados, por PCR, utilizando *REC-primers* S2-REC.** Linha 1: Padrão de tamanho molecular 50 *bp* *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen). Linhas 2-11: amplificação do fragmento da região 2C (189 pb) e 3D (225 pb) do poliovírus tipo 2 por RT-PCR.

## 5.10 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 2C E 3D DO GENOMA DE POLIOVÍRUS TIPO 3

Fragmentos das regiões 2C e 3D do poliovírus tipo 3 foram amplificados pela técnica de RT-PCR, utilizando o par de *primers* S3-REC. Todas as 2 amostras poliovírus tipo 3 mostraram produtos de amplificação com o tamanho característico (2C – 199 pb e 3D – 228 pb), após realização da eletroforese em gel de agarose 1% e coloração com solução de brometo de etídeo (Figura 19). Nenhuma amostra mostrou ser recombinante nas regiões 2C e 3D do genoma.



**Figura 19: Perfil eletroforético, em gel de poliacrilamida, dos produtos amplificados, por PCR, utilizando REC-primers S3-REC.** Linha 1: Padrão de tamanho molecular 50 bp *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen). Linhas 2-5: amplificação do fragmento da região 2C (199 pb) e 3D (228 pb) do poliovírus tipo 3 por RT-PCR.

## 5.11 SEQÜENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

### 5.11.1 Seqüenciamento e análise da região 5'-NCR dos poliovírus tipo 1 isolados

As seqüências nucleotídicas obtidas da região 5'-NCR dos poliovírus tipo 1 isolados foram alinhadas com as seqüências correspondentes às da cepa padrão P1/Sabin (REZAPKIN et al., 1994), visando a observação dos nucleotídeos das posições 480 e 525. Os resultados encontram-se na Tabela 02 e as diferenças encontradas estão indicadas em negrito.

	<b>Posição 480</b>	<b>Posição 525</b>
<b>P1/Sabin</b>	<b>G</b>	<b>U</b>
P1/26826	G=A	U
P1/26827	G<A	U
P1/26831	G=A	U
P1/28090	G<A	U
P1/30808	G=A	U

Tabela 02: Diferenças nucleotídicas observadas nas posições 480 e 525 da região 5'-NCR dos poliovírus tipo 1 isolados, em relação à cepa vacinal P1/Sabin padrão.

As amostras P1/26826, P1/26831 e P1/30808 apresentaram, na mesma proporção, uma base G e uma base A no nucleotídeo 480, indicando que pelo menos duas subpopulações estão presentes, uma mantendo a base G, enquanto a outra reverteu para A neste nucleotídeo. As amostras P1/26827 e P1/28090 mantiveram a base G no nucleotídeo 480, embora uma subpopulação de revertentes apresentando uma base A nesta posição também foi observada.

Todas as amostras mantiveram a base U no nucleotídeo 525.

#### 5.11.2 Seqüenciamento e análise da região 5'-NCR dos poliovírus tipo 2 isolados

Através do seqüenciamento nucleotídico parcial da região 5'-NCR dos poliovírus do tipo 2 isolados, foi possível obter seqüências que posteriormente foram alinhadas, com a cepa P2/Sabin (REZAPKIN et al., 1999), visando a observação do nucleotídeo das posições 481. Os resultados encontram-se na Tabela 03 e as diferenças encontradas estão indicadas em negrito.

<b>Isolado</b>	<b>Posição 481</b>
<b>P2/Sabin</b>	<b>A</b>
P2/26177	A
P2/26178	A
P2/26180	A
P2/26181	A
P2/26182	A
P2/26183	A
P2/26184	A
P2/26185	A
P2/26825	A
P2/26828	A
P2/26829	A<G
P2/26830	A
P2/26832	A
P2/28088	A
P2/28089	A
P2/28094	A
P2/28095	A
P2/30805	G
P2/30806	G
P2/30807	A

**Tabela 03: Diferenças nucleotídicas observadas na posição 481 da região 5'-NCR dos poliovírus tipo 2 isolados, em relação à cepa vacinal P2/Sabin padrão.**

Vinte amostras de poliovírus sorotipo 2 foram analisadas. As amostras P2/30805 e P2/30806 apresentaram a reversão  $A_{481} \rightarrow G$ . A amostra P2/26829 manteve a base A no nucleotídeo 481, embora uma subpopulação revertente, apresentando a uma base G nesta posição, também foi observada.

### 5.11.3 Seqüenciamento e análise da região 5'-NCR dos poliovírus tipo 3 isolados

As seqüências obtidas, de parte da região 5'-NCR dos poliovírus tipo 3 isolados, foram alinhadas, com a cepa P3/Sabin (STANWAY et al., 1983), visando a observação do nucleotídeo da posição 472. Os resultados encontram-se na Tabela 04 e as diferenças encontradas estão indicadas em negrito.

<b>Isolado</b>	<b>Posição 472</b>
<b>P3/Sabin</b>	<b>U</b>
P3/26179	C
P3/30809	C

Tabela 04: Diferenças nucleotídicas observadas na posição 472 da região 5'-NCR dos poliovírus tipo 3 isolados, em relação à cepa vacinal P3/Sabin padrão.

As amostras P3/26179 e P3/30809 apresentaram a base revertente C no nucleotídeo 472.

#### 5.11.4 Seqüenciamento e análise da região VP1 dos poliovírus isolados

As seqüências completas de nucleotídeos do gene que codifica a principal proteína de capsídeo viral, VP1 (poliovírus tipo 1 = 906 nt, poliovírus tipo 2 = 903 nt e poliovírus tipo 3 = 900 nt), das 27 amostras de poliovírus isoladas foram alinhadas com as das cepas padrões de referência (Human poliovirus strain Sabin 1 complete genome, strain Sabin 1 [número de acesso V01150], Human poliovirus strain Sabin 2 complete genome, strain Sabin 2 [número de acesso AY184220], Human poliovirus strain Sabin 3 complete genome, strain Sabin 3 [número de acesso AY184221]). Para cada isolado, os nucleotídeos que são idênticos à cepa padrão estão representados por pontos (.), enquanto que aqueles que diferem dos padrões estão representados pelas bases A, T, G ou C (Figura 20).

Todas as seqüências nucleotídicas foram traduzidas em seqüências de aminoácidos pelo programa BioEdit com o objetivo de identificar se as diferenças nucleotídicas resultariam em alterações nas seqüências protéicas codificadas. Na Figura 21 está representado o alinhamento de 302, 301 e 300 aminoácidos da região de VP1 dos 27 isolados pertencentes aos sorotipos 1, 2 e 3 respectivamente, em comparação com seus respectivos padrões.

#### 5.11.5 **Poliovírus tipo 1**

Através do alinhamento de 906 nucleotídeos do gene VP1 foi possível observar que todos os cinco isolados pertencentes ao tipo 1, apresentaram 100% de identidade nucleotídica entre si e com a cepa padrão.

#### 5.11.6 **Poliovírus tipo 2**

Nas análises comparativas das seqüências nucleotídicas dos 20 isolados pertencentes ao tipo 2, 16 isolados apresentaram uma única diferença localizada na posição 2807 (A→G) que resultou na mudança de aminoácido no resíduo 109 (L→A). Os quatro isolados restantes apresentaram 100% de identidade nucleotídica entre si e com a cepa padrão.

O isolado 26183 apresentou duas diferenças nucleotídicas adicionais além da diferença na posição 2807 (A→G): 2789 (G→A) e 2828 (T→G).

O isolado 26184, quando comparado à cepa padrão, apresentou duas substituições nucleotídicas nas posições 2807 (A→G) e 2945 (A→G).

**Na Tabela 05 estão relacionadas as diferenças nucleotídicas encontradas entre os poliovírus tipo 2 isolados e as alterações de aminoácidos acarretadas.**

#### 5.11.7 **Poliovírus tipo 3**

Quando comparadas com a cepa padrão as duas amostras isoladas apresentaram apenas uma substituição nucleotídica na posição 2493 (C→T), acarretando na alteração de aminoácido (Tabela 06).

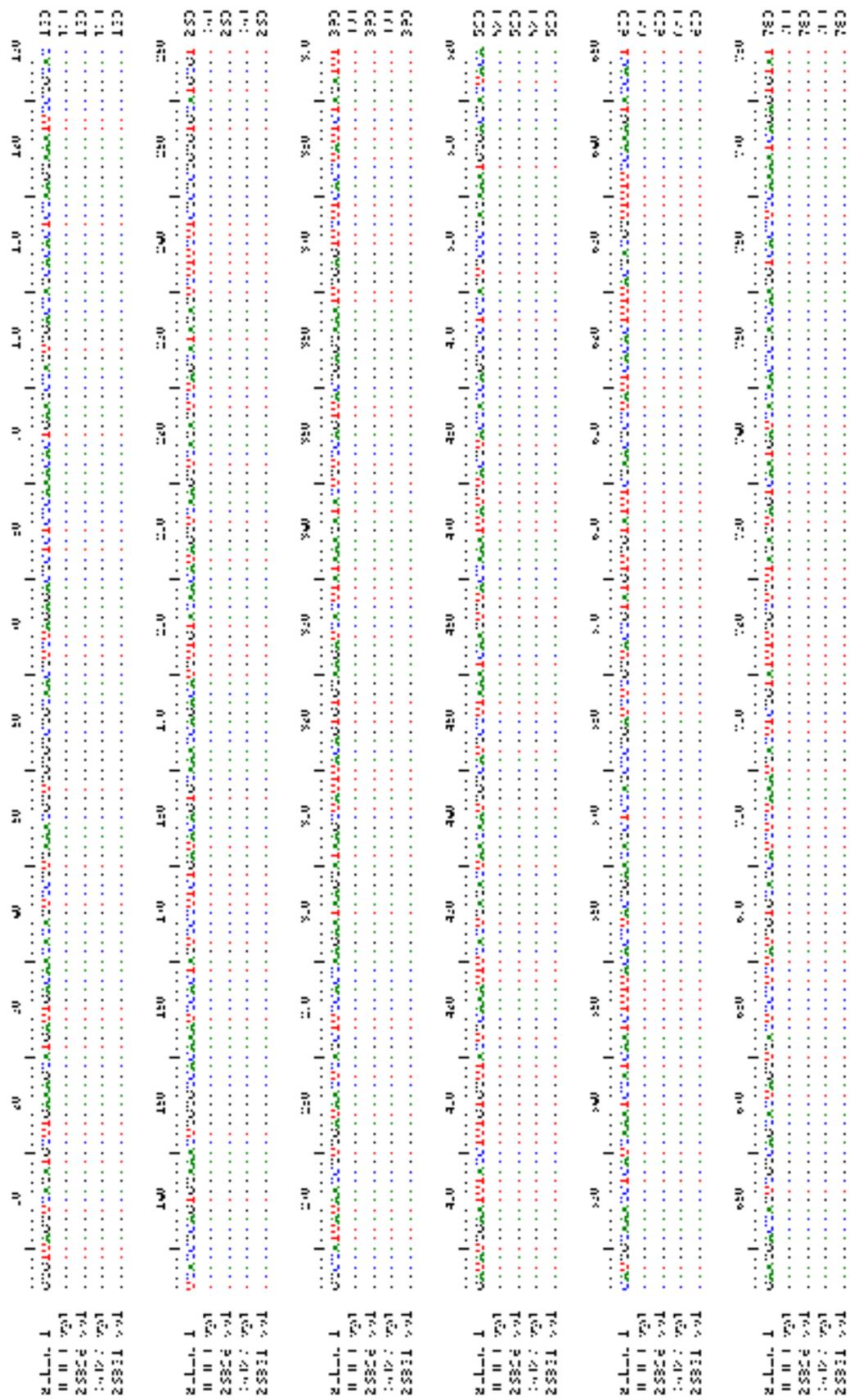
Isolado	Posição	Alteração	Resíduo de aa	Aminoácido
P2/26177	2807	A→G	109	K→R
P2/26178	2807	A→G	109	K→R
P2/26180	2807	A→G	109	K→R
P2/26181	2807	A→G	109	K→R
P2/26182	2807	A→G	109	K→R
P2/26183	2789	G→A	103	R→K
	2807	A→G	109	K→R
	2828	T→G	116	V→G
P2/26184	2807	A→G	109	K→R
	2945	A→G	155	Y→C
P2/26185	2807	A→G	109	K→R
P2/26825	-	-	-	-
P2/26828	2807	A→G	109	K→R
P2/26829	2807	A→G	109	K→R
P2/26830	2807	A→G	109	K→R
P2/26832	2807	A→G	109	K→R
P2/28088	2807	A→G	109	K→R
P2/28089	2807	A→G	109	K→R
P2/28094	2807	A→G	109	K→R
P2/28095	2807	A→G	109	K→R
P2/30805	-	-	-	-
P2/30806	-	-	-	-
P2/30807	-	-	-	-

**Tabela 05: Substituições nucleotídicas e de aminoácidos observadas na região do gene da proteína VP1 de isolados do sorotipo 2 quando comparados com a cepa vacinal P2/Sabin padrão.** Legenda: K = Lisina; R = Arginina; V = Valina; G = Glicina; Y = Tirosina; C = Cisteína.

Isolado	Posição	Resíduo de aa	Aminoácido
P3/Sabin	2493	6	T
P3/26179	2493	6	T→I
P3/30809	2493	6	T→I

**Tabela 06: Substituições nucleotídicas e de aminoácidos observadas na região do gene da proteína VP1 de isolados do sorotipo 3 quando comparados com a cepa vacinal P3/Sabin padrão.** Legenda: T = Treonina; I = Isoleucina

Figura 20: Alinhamento das seqüências nucleotídicas da região de





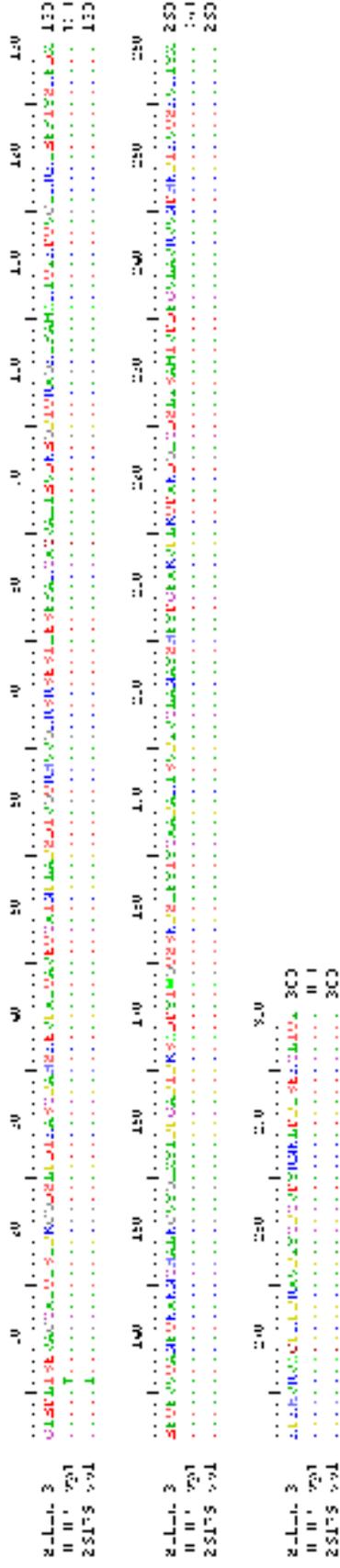












**Legenda:** A = Alanina; R = Arginina; N = Asparagina; D = Ácido Aspártico; C = Cisteína; E = Ácido Glutâmico; Q = Glutamina;  
 G = Glicina; H = Histidina; I = Isoleucina; L = Leucina; K = Lisina; M = Metionina; F = Fenilalanina; P = Prolina; S = Serina;  
 T = Treonina; W = Triptofano; Y = Tirosina; V = Valina

#### A) ANÁLISE DA CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE POLIOVÍRUS TIPO 1 ISOLADOS DE AMOSTRAS DO MEIO AMBIENTE.

As análises das seqüências nucleotídicas dos poliovírus do tipo 1 isolados, demonstraram que todos os cinco isolados mutaram no nucleotídeo G<sub>480</sub>→A da região 5'-NCR. Esta mutação tem sido reconhecida por vários autores como estando associada à reversão da cepa atenuada P1/Sabin para o fenótipo neurovirulento. As cepas P1/26826, P1/26831 e P1/30808 apresentaram a base G (encontrada na cepa atenuada Sabin) e a base A (encontrada na cepa virulenta Mahoney) no nucleotídeo 480, aproximadamente na mesma proporção, indicando que pelo menos duas subpopulações estão presentes, uma mantendo a base G, enquanto a outra reverteu para A neste nucleotídeo. As cepas P1/26827 e P1/28090 mantiveram a base G no nucleotídeo 480, embora uma pequena subpopulação de revertentes apresentando a base A nesta posição tenha sido observada. Esta observação poderia sugerir que estes isolados apresentem um aumento de neurovirulência, o que, entretanto só poderia ser confirmado através de testes de neurovirulência em camundongos transgênicos ou em macacos.

FRIEDRICH e colaboradores (1995) analisaram quatro isolados de casos de paralisia classificados como Síndrome de Guillain Barré no Brasil. Três isolados mutaram no nucleotídeo 480 de G→A. Além disso, todas as cepas cVDPVs do tipo 1 isoladas a partir de casos de poliomielite associados à vacina tanto na ilha Caribena de Hispanhola em 2000-01, como nas Filipinas em 2001, apresentaram a mutação revertente G<sub>480</sub>→A (KEW et al., 2004, SHIMIZU et al., 2004). Durante o surto, como complemento da atividade de pesquisa de AFP, a pesquisa de poliovírus no ambiente (EPS) foi implantada. Sete cepas cVDPVs tipo 1 isoladas de amostras ambientais demonstraram a substituição G<sub>480</sub>→A (VINJÉ et al., 2004).

A homologia de 100% apresentada entre os nossos isolados, na região de VP1, quando comparados com a cepa atenuada P1/Sabin de referência demonstra a ausência de circulação dessas amostras nas comunidades.

## B) ANÁLISE DA CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE POLIOVÍRUS TIPO 2 ISOLADOS DE AMOSTRAS DO MEIO AMBIENTE

O seqüenciamento nucleotídico parcial da região 5'-NCR e total da região do gene VP1 dos poliovírus tipo 2 isolados e, a comparação com a seqüência nucleotídica da cepa P2/Sabin, confirmou a origem vacinal destes poliovírus, e também permitiu detectar mutações nestas regiões.

A mutação A<sub>481</sub>→G, observada em poliovírus tipo 2 isolados de casos de VAPP, também tem sido observado em poliovírus tipo 2 isolados de fezes de contatos saudáveis de casos associados à vacina e de fezes de indivíduos vacinados saudáveis (MINOR & DUNN, 1998; DUNN et al., 1990; MACADAM et al., 1991a; FRIEDRICH et al., 1995), demonstrando uma forte seleção contra a base A no nucleotídeo 481 durante a replicação da cepa P2/Sabin no intestino humano. Cepas VDPVs tipo 2 isoladas a partir de casos de paralisia no Egito apresentaram G<sub>481</sub>, mas diferentemente da maioria dos isolados Sabin-like, as seqüências 5'-NCR envolvidas provavelmente derivaram de outros enterovírus. Os isolados também apresentaram troca de aminoácido Ile→Thr na VP1<sub>143</sub> (YANG et al., 2003).

É interessante observar que a maioria das cepas isoladas no presente estudo manteve a base A nesta posição. Uma possibilidade é a de que uma ou mais mutações no genoma viral puderam influenciar na seleção da base A no nucleotídeo 481 (MINOR et al., 1993). Não podemos descartar a possibilidade de que certas características bioquímicas de fatores do hospedeiro interagindo com a região 5'-NCR do RNA viral poderiam selecionar isolados mantendo a base A no nucleotídeo 481 (SVITKIN, 1988).

A mutação U<sub>2909</sub>→A levando a substituição de Ile por outros aminoácidos em VP1<sub>143</sub>, não foi observada em nenhum dos poliovírus do tipo 2 isolados. Como supracitado não se pode descartar a possibilidade da atuação de fatores do hospedeiro sobre região 5'-NCR do RNA viral, induzindo a seleção de isolados mantendo U<sub>2909</sub>.

A comparação da seqüência nucleotídica dos poliovírus tipo 2 isolados com a seqüência da cepa P2/Sabin padrão permitiu a identificação de várias diferenças nucleotídicas. Dezesseis isolados apresentaram A<sub>2807</sub>→G levando a substituição do aminoácido Lys por Arg no resíduo 109 de VP1. O isolado P2/26183 apresentou G<sub>2789</sub>→A levando a substituição Arg<sub>103</sub>→Lys e a mutação T<sub>2828</sub>→G (Val<sub>116</sub>→Gly), enquanto a cepa P2/26184 apresentou a mutação A<sub>2945</sub>→G (Cys<sub>155</sub>→Tyr). Nenhuma das mutações encontradas têm sido implicadas como fatores principais para mudanças na virulência de poliovírus tipo 2, entretanto, a possibilidade de estas mutações revertentes terem algum efeito na reversão da cepa P2/Sabin à neurovirulência ou de apresentarem algum papel no estabelecimento da doença não pode ser

descartada. Além disto, estas mutações podem também conferir alguma vantagem seletiva como conseqüência da adaptação da cepa P2/Sabin para a replicação no intestino.

A cepa P2/26183 apresentou 99,6% de divergência nucleotídica em comparação com a cepa P2/Sabin de referência e a cepa P2/26284 apresentou 99,3% de divergência nucleotídica em VP1. Estas mudanças não podem ser consideradas críticas com relação à presença prolongada dessas amostras no meio ambiente, mais provavelmente, devem-se à alta eficiência de replicação e tradução do genoma dos poliovírus do tipo 2, com a conseqüente tendência ao acúmulo de mutações.

### C) ANÁLISE DA CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE POLIOVÍRUS TIPO 3 ISOLADOS DE AMOSTRAS DO MEIO AMBIENTE.

As análises das seqüências nucleotídicas dos dois poliovírus do tipo 3 isolados revelou que estes apresentavam duas mutações importantes envolvidas na reversão ao fenótipo neurovirulento: U<sub>472</sub>→C da região 5'-NCR (WESTROP et al., 1989; CHUMAKOV et al., 1991) e Ile<sub>6</sub>→Thr (U<sub>2034</sub>→C) de VP1 (WEEKS-LEVY et al., 1991; TATEM et al., 1992). A mutação revertente U<sub>472</sub>→C da região 5'-NCR foi observada em todos os poliovírus derivados da cepa P3/Sabin isolados de fezes e/ou SNC de casos de VAPP (ALMOND et al., 1984, 1985; CANN et al., 1984; EVANS et al., 1985; MINOR et al., 1989, MACADAM et al., 1989; GEORGESCU et al., 1994; DRIESEL et al., 1995), isolados de um paciente apresentando hipogamaglobulinemia (MARTIN et al., 2000) e em um tipo 3 aVDPV isolado a partir de uma amostra de água de esgoto na Estônia em 2002 (BLOMQVIST et al., 2004).

Estudos sugeriram que U<sub>2493</sub>→C, levando a uma substituição de Ile<sub>6</sub>→Thr de VP1, também apresenta algum efeito na atenuação (WEEKS-LEVY et al., 1991; TATEM et al., 1992). O aminoácido Ile<sub>6</sub> está localizado na região N-terminal de VP1, região esta que atua na entrada do vírus na célula susceptível. Esta região de VP1 é externalizada e a sua exposição é necessária para a ligação dos lipossomas. A substituição de Ile<sub>6</sub>→Thr parece enfraquecer a externalização do N-terminal (FRICK & HOGLE, 1990).

### D) IMPLICAÇÕES DE CVDPVS PARA O PLANO DE ERRADICAÇÃO GLOBAL DA POLIOMIELITE

O principal risco para a poliomielite em todo o mundo envolve a infecção por poliovírus selvagem. Entretanto a maior parte deste risco está localizada em poucos

reservatórios na África e na Ásia. No restante do mundo, o problema deriva do contínuo uso da OPV. Em decorrência dos recentes surtos de poliomielite associados com o envolvimento de VDPVs em Hispanhola, Filipinas, Egito e Madagascar, a pesquisa de cepas VDPV tornou-se uma parte importante na pesquisa de rotina para poliovírus selvagens dentro da Iniciativa de Erradicação Global.

Todos os surtos ocasionados por cVDPVs foram restritos a ilhas, entretanto, se um surto cVDPV ocorresse em a população central do continente, a incidência de casos de VAPP superaria drasticamente a taxa de casos registrados anualmente, e poderia ser igualada àquelas registradas nos surtos de poliovírus selvagens (KEW et al., 2004).

O plano de ação está ligado a três estágios principais de erradicação: pré-erradicação, pós-erradicação global, e pós-OPV. O estágio atual de pré-erradicação demonstra os avanços na interrupção da transmissão dos poliovírus selvagens. A circulação do poliovírus tipo 2 não tem sido notificada em todo o mundo desde outubro de 1999, e a circulação do poliovírus tipo 3 tornou-se altamente focalizada em somente 4 países em 2005. O maior contratempo desde a adoção do plano global foi a detecção em 22 países de surtos devido a importação do poliovírus tipo 1. Em março de 2006, 14 destes 22 países não notificaram casos por mais de 6 meses e aparentemente retornaram ao *status* de área livre da pólio.

O período de pós-erradicação irá começar um ano após detecção do último poliovírus selvagem. O período de pós-OPV começará com a interrupção em todo o mundo da administração de OPV. Entretanto, a suspensão da vacinação irá inevitavelmente resultar em um dramático crescimento de uma população não imunizada e criar uma oportunidade para uma rápida disseminação de poliovírus emergentes.

KOROTKOVA e colaboradores (2003) realizaram uma análise da interrupção do uso de OPV em uma região da República da Bielorrússia ocorrida durante o período de 1963 a 1966, demonstrando a circulação disseminada de poliovírus OPV-derivados dentro de uma comunidade não imunizada. A imunização com a vacina OPV trivalente começou em 1959. A partir de 1961 a 1966, dois *rounds* de campanha nacional em massa foram conduzidas durante o período inverno-primavera, atingindo >90% de nível de cobertura vacinal. No entanto, crianças de dois distritos (uma população total de 160.000) não foram imunizadas a partir de março de 1963 a março de 1966, exceto 40 crianças em seis enfermarias que receberam uma única dose da OPV trivalente em março de 1955. A pesquisa de anticorpos anti-poliiovírus no soro de crianças nascidas pelo menos 1 ano após a interrupção da OPV demonstrou que 21 crianças (de um total de 57) apresentavam títulos iguais ou maiores a 1:8 de anticorpos neutralizantes para o poliovírus do tipo 2. A análise também demonstrou a disseminação e evolução de linhagens independentes de VDPVs. Três isolados apresentaram genomas

recombinantes contendo a região 5'-NCR e a região de capsídeo derivada de P2/Sabin, dois destes contendo as regiões das proteínas não estruturais de P1/Sabin e, outro de um vírus não identificado. Um isolado apresentou seqüência nucleotídica semelhante a um poliovírus tipo 1 selvagem isolado durante o mesmo período (agosto de 1965) em uma outra cidade da Bielorrússia.

A pesquisa de AFP é o modelo padrão no programa da WHO de erradicação global dos poliovírus selvagens. A pesquisa de VDPVs começou em 1997 nas Américas, com o seqüenciamento dos genes VP1 dos poliovírus isolados a partir de casos de AFP na região (DA SILVA et al., 2000). Infelizmente, esta abordagem não preveniu a tempo o surto ocorrido em Hispanhola porque nenhum poliovírus havia sido isolado 5 anos precedendo o surto (KEW et al., 2000). A ocorrência de casos de VDPVs também realça a necessidade dos países em manter uma pesquisa sensível de poliovírus. Imediatamente após o surto de VDPVs em Hispanhola, uma triagem intensiva de VDPV no ambiente foi imediatamente iniciada pelos laboratórios dentro da rede de Laboratórios Global Pólio WHO (WHO, 2002; 2005). O tipo 2 VDPVs é o mais freqüentemente detectado e tem sido isolado intermitentemente a partir de água de esgoto coletada na Eslováquia, Egito e Israel (WHO, 2005). De acordo com outros estudos VDPVs foram isolados a partir de água de esgoto e de rio no Japão dentro de três meses após a vacinação com a OPV, e vários destes VDPVs 1 e 3 isolados mostraram aumento da neurovirulência (HORIE et al., 2002; YOSHIDA et al., 2002). Mais recentemente, um poliovírus tipo 3 mostrando 13% de divergência da cepa P3/Sabin foi isolado da Estônia (BLOMQVIST et al., 2004). Um pesquisa no Egito revelou uma prolongada e extensiva circulação do poliovírus tipo 1 selvagem ao mesmo tempo em que os casos positivos de poliovírus e AFP eram raramente raros (EL BASSIONI et al., 2003)

A capacidade de vírus vacinais geneticamente mutados de se replicarem por cerca de 2 nos antes da sua detecção, como nos surtos de Hispanhola e Filipinas, ambas declaradas como áreas livres da pólio, enfatiza a dificuldade e importância de uma pesquisa com elevada sensibilidade na era pós-erradicação. Metodologias utilizando amostras de água para testar a presença e poliovírus incrementaria a sensibilidade da pesquisa de AFP.

EPS tem previamente demonstrado o isolamento de cepas derivadas da vacina apresentando um fenótipo selvagem sem que qualquer caso de poliomielite parálitica fosse reportado (HOVI et al., 1986; MANOR et al., 1999). Um derivado P2/Sabin isolado a partir de água de esgoto, na ausência de casos de pólio em Israel, demonstrou 91,7% de identidade nucleotídica com P2/Sabin na região de capsídeo P1 e tinha readquirido algumas características relacionadas ao tipo selvagem. A extensa divergência genética sugere que este

vírus tenha se replicado em um ou mais indivíduos aproximadamente por seis anos (SHULMAN et al., 2000).

Em 1989 foi isolado o último poliovírus selvagem no Brasil e a contínua pesquisa de casos AFP e de poliovírus no Brasil não tem detectado qualquer infecção pelo poliovírus selvagem após este ano. Desde então as taxas de cobertura nacional de imunização com a OPV no Brasil têm sido geralmente altas (acima de 95%). No período de 2001 a 2005 as taxas de cobertura vacinal com a OPV variaram entre 95 a 100% (MS, 2006). Entretanto, o surto em Filipinas demonstrou que o uso de OPV em níveis de cobertura de pouco abaixo do desejado (~ 80% à época) (MMWR, 2001a) pode induzir a emergência e a disseminação de VDPVs em países onde o poliovírus selvagem tenha sido erradicado se falhas na imunização forem desenvolvidas em áreas locais com risco potencial elevado para a circulação de poliovírus (MMWR, 2000; 2001, 2002), o que realça a importância em se manter altos níveis de cobertura vacinal no país.

Estudos moleculares de vírus vacinais isolados de casos de AFP no Brasil mostraram pouca variabilidade genética sugerindo uma transmissão limitada (DA SILVA et al., 1998). A população brasileira é altamente imunizada contra a pólio, o que limita a disseminação de cepas OPV excretadas. Entretanto, a experiência tem demonstrado a crescente dificuldade em manter altos níveis de cobertura vacinal em países e regiões certificados como áreas livres da poliomielite (KEW et al., 2004).

Após a interrupção da imunização com a OPV, existe um risco de 3-5 anos de emergência de cVDPVs. Em adição, os raros casos de iVDPVs possuem um risco para a reintrodução de poliovírus na população (WHO, 2006).

Considerando os riscos e benefícios potenciais inerentes a decisões relativas ao momento e a maneira de interromper a vacinação com a OPV e a sua substituição por uma vacina inativada (Salk) será necessário contar com a disponibilidade de conhecimentos científicos, uma análise dos riscos e benefícios, planos de contingência, reservas de vacina contra o poliovírus, e a aprovação dos comitês mundiais normativos. Uma questão crucial é se a transmissão das cepas vacinais excretadas pode prolongar-se de maneira que o poliovírus consiga reaparecer em uma futura população não imunizada. A interrupção global da utilização da OPV apresenta riscos em longo prazo que precisam ser considerados como o aparecimento de um elevado número de pessoas susceptíveis a poliomielite; epidemias após a liberação de poliovírus a partir das fontes de contenção intencionalmente ou não; poliovírus derivado da vacina revertendo e adquirindo características dos poliovírus selvagens (WOOD; SUTTER; DOWDLE, 2000).

Apesar da erradicação dos poliovírus selvagens no Brasil, é importante ser lembrado que as cepas Sabin foram derivadas de cepas selvagens neurovirulentas e que poucas mutações são aparentemente necessárias para que as cepas das cepas Sabin readquiram características biológicas, principalmente a neurovirulência, similares àquelas apresentadas pelas amostras selvagens. Portanto, há a necessidade de que as taxas de cobertura vacinal mantenham-se as mais altas possíveis para evitar a transmissão de cepas vacinais com neurovirulência aumentada a outros indivíduos. Neste caso a transmissão de tais cepas aumentaria a probabilidade do desenvolvimento da doença e também poderia levar novamente a circulação de cepas neurovirulentas de origem vacinal, o que poderia constituir-se em grande problema de saúde pública caso a vacinação fosse suspensa repentinamente.

Indivíduos vacinados saudáveis também podem excretar vírus vacinais altamente neurovirulentos, demonstrando que existe o potencial de sua transmissão a indivíduos suscetíveis e a sua circulação. Talvez a erradicação total da doença e do vírus (evitando casos associados à vacina) necessite a substituição da vacina Sabin por uma vacina inativada (Salk) ou outra vacina molecular, impedindo a reintrodução do vírus na natureza.

Como a poliomielite causada por cepas selvagens ainda ocorre em alguns países, sempre existe a possibilidade da reintrodução de cepas selvagens originárias desses outros países. Portanto, há a necessidade da continuidade da vacinação com a vacina Sabin, que tem sido ampla e eficientemente utilizada com o objetivo de erradicar a poliomielite e em outros países. Simultaneamente, o estudo de caracterização molecular de amostras de poliovírus isolados pode auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da doença, e auxiliar na eliminação ou redução dos casos associados à vacina, através do desenvolvimento de vacinas incapazes de reverter a neurovirulência.

- Algumas amostras virais isoladas do meio ambiente demonstraram possuir mutações consideradas importantes para a neurovirulência.
  
- Nenhuma das amostras de poliovírus vacinal isoladas mostraram ser recombinantes.
  
- Nenhuma amostra de poliovírus derivado (VDPV) foi isolada durante o período do estudo, indicando que as taxas de cobertura vacinal tem sido suficientes para que as amostras virais não sejam amplamente disseminadas na população.
  
- A vigilância ambiental mostrou ser uma ferramenta útil na monitorização do programa de erradicação da poliomielite.

AGOL, V. I. The 5'-untranslated region of picornaviral genomes. **Advances in Virus Research.** v.40, p. 103-180, 1991.

AGOL, V.I. et al. Restricted growth of attenuated poliovirus strains in culture cells of a human neuroblastoma. **Journal of Virology.** v.63, p. 4034-4038, 1989.

ALEXANDER, J.P.; GARY, H.E.; PALLANSCH, M.A. Duration of poliovirus excretion and its implication for acute flaccid paralysis surveillance: a review of the literature. **Journal of Infectious Diseases.** v. 175, (Suppl 1), p.176S-182S, 1997.

ALMOND, J.W. The attenuation of poliovirus neurovirulence. **Ann. Rev. Microbiol.** v.41, p. 153-180, 1987.

ALMOND, J.W. et al. Attenuation and reversion to neurovirulence of the sabin poliovirus type 3 vaccine. **Vaccines.** 85 ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 271-277. 1985.

ALMOND, J.W. et al. New poliovirus vaccines: a molecular approach. **Vaccine.** v.2, p. 177-184. 1984.

ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology,** v.215, p. 403-410, 1990.

ANDRUS, J.K. et al. Risk of vaccine-associated paralytic poliomyelitis in Latin America, 1989-1991. **Bulletin of the World Health Organization,** v. 73, n. 1, p. 33-40, 1995.

BELLMUNT, A. et al. Evolution of poliovirus type 1 during 5.5 years of prolonged enteral replication in an immunodeficient patient. **Virology,** v. 265, p. 178-184, 1999.

BENYESH-MELNICK, M.; MELNICK, J.L. The use of in vitro markers and monkey neurovirulence tests to follow genetic changes in attenuated poliovirus multiplying in the human alimentary tract. In: **First International Conference on Live Poliovirus Vaccines.** Washington: Pan American Sanitary Bureau, p.179-198, 1959.

BLOMQVIST, S. et al. Characterization of a highly evolved vaccine derived poliovirus type 3 isolated from sewage in Estonia. **Journal of Virology**, v.78, n. 9, p. 4876-4883, may 2004.

BORZAKIAN, S. et al. Precise missense and silent point mutations are fixed in the genome of poliovirus mutants from persistently infected cells. **Journal of Virology**, v.67, n. 5, p. 2914-2917, may 1993.

BOUCHARD, M.J.; LAM, D.H.; RACANIELLO, V.R. Determinants of attenuation and temperature sensitivity in the type 1 poliovirus sabin vaccine. **Journal of Virology**, v. 69, n. 8, p. 4972-4978, aug. 1995.

BROWN, B.A. et al. Complete genomic sequencing shows that poliovirus isolated and members of human enterovirus species C are closely related in the non capsid coding region. **Journal of Virology**, v.77, p. 8973-8984, 2003.

CAMMACK, N. et al. Intertypic genomic rearrangements of poliovirus strains in vaccinees. **Virology**, v.167, p. 507-514, 1988.

CANN, A.J. et al. Reversion to neurovirulence of the live attenuated sabin type 3 oral poliovirus vaccine. **Nucleic Acids Research**, v.12, p. 7787-7792, 1984.

CHERKASOVA, E.A. et al. Long term circulation of vaccine derived poliovirus that causes paralytic disease. **Journal of Virology**, v.76, n. 13, p. 6791-6799, jul. 2002.

CHRISTODOULOU, C. et al. Mapping of mutations associated with neurovirulence in monkeys infected with Sabin 1 poliovirus revertants selected at high temperature. **Journal of Virology**, v.4, n. 10, p. 4922-4929, oct. 1990.

CHUMAKOV, K.M. et al. Correlation between amount of virus with altered nucleotide sequence and monkey test for acceptability of oral poliovirus vaccine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 199-203, jan. 1991.

CONTRERAS, G. et al. Genetic characterization of Sabin types 1 and 3 poliovaccine virus following serial passage in the human intestinal tract. **Biologicals**, v.20, p.15-26, 1992.

CUERVO, N.S. et al. Genomic features of intertypic recombinant Sabin poliovirus strains excreted by primary vaccines. **Journal of Virology**, v.75, n. 13, p. 5740-5751, jul. 2001.

DA SILVA, E.E. Molecular characterization of vaccine-derived poliovirus isolates found in Brazil after eradication of the indigenous wild poliovirus. In: **Meeting on the scientific basis for stopping polio immunization, Geneva**. p. 23-25, 1998.

DE, L. et al. Identification of vaccine-related poliovirus by hybridization with specific RNA probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n. 3, p. 562-571, mar. 1995.

DEBROT, M.A. et al. Molecular detection of an importation of type 3 wild poliovirus into Canada from Netherlands in 1993. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p. 519-523, 1997.

de-QUADROS, C.A. et al. Eradication of wild poliovirus from the Americas: Acute flaccid paralysis surveillance, 1988-1995. **Journal of Infectious Diseases**, v. 175, (Suppl 1), p. 37S-42S, 1997.

DESHPANDE, J.M.; SHETTY, S.J.; SIDDIQUI, Z.A. Environmental surveillance system to track wild poliovirus transmission. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n. 5, p. 2919-2927, may 2003.

DIAMENT, A.J.; KOK, F. Poliomielite. In: **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8 ed. Veronesi, R.. p. 71-77, 1991.

DIVIZIA, M. et al. Genomic characterization of human and environmental polioviruses isolated in Albania. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3534-3539, aug. 1999.

DORSAM, V. et al. Increased safety level of serotype 3 sabin oral poliomyelitis vaccine lots by improved seed virus, and tissue culture and virus infection conditions. **Vaccine**, v. 18, p. 2435-2443, 2000.

DOWDLE, W.; BIRMINGHAM, M.E. The biologic principles of poliovirus eradication. **Journal of Infectious Diseases**, v.175, p. 286S-292S, 1997.

DRIESEL, G. et al. Vaccine-associated cases of poliomyelitis over a 30 year period in east Germany. **European Journal of Epidemiology**, v.11, p. 647-654, 1995.

DUNN, G. et al. Virus excretion and mutation by infants following primary vaccination with live oral poliovaccine from two sources. **Journal of Medical Virology**, v.32, p. 92-95, 1990.

EGGER, D.; BIENZ, K. Recombination of poliovirus RNA probes proceeds in mixed replication complexes originating from distinct replication start sites. **Journal of Virology**, v. 76, n. 21, p. 10960-10971, nov. 2002.

EL BASSIONI, L. et al. Prolonged detection of indigenous wild polioviruses sewage from communities in Egypt. **American Journal of Epidemiology**, v.158, p. 807-815, 2003.

EQUESTRE, D.M. et al. Identification of a consistent pattern of mutations in neurovirulence variants derived from the sabin vaccine strain of poliovirus type 2. **Journal of Virology**, v.65, p. 2707-2710, 1991.

ESTEVEZ, K. Safety of oral poliomyelitis vaccine results of a WHO enquiry. **Bulletin of World Health Organization**, v. 66, p. 739-746, 1988.

EVANS, D.M. et al. Increased neurovirulence associated with a single nucleotide change in a noncoding region of the sabin type 3 poliovaccine genome. **Nature**, v. 314, p. 548-550, 1985.

FILMAN, D.J. et al. Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. **EMBO**, v.8, p. 1567-1579, 1989.

FIORE, L. et al. Antigenic and biochemical characterization of poliovirus type 2 isolated from two cases of paralytic disease. **Intervirology**, v.27, n. 7, p. 196-204, jul. 1987.

FRICK, C.E.; HOGLE, J.M. Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. **Journal of Virology**, v.64, p. 1934-1945, 1990.

FRIEDRICH, F. **Caracterização genômica de amostras de poliovírus tipos 2 e 3 isolados de casos de poliomielite parálitica associados a vacina Sabin no Brasil.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1993. Dissertação (Mestrado) Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

FRIEDRICH, F. **Uma análise genética e molecular da atenuação e neurovirulência dos poliovírus.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1992. Dissertação (Monografia) Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

FRIEDRICH, F. et al. Genomic modifications of type 2 polioviruses from vaccine-associated cases in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 733-742, 1995.

FURIONE, M. et al. Polioviruses with natural recombinant genomes isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis. **Virology**, v. 196, p. 199-208, 1993.

GEORGESCU, M.M. et al. Evolution of the sabin type 1 poliovirus in humans: characterization of the strains isolated from patients with vaccine associated paralytic poliomyelitis. **Journal of Virology**, v.71, n. 10, p. 7758-7768, oct. 1997.

GEORGESCU, M.M. et al. High diversity of poliovirus strains isolated from the central nervous system from patients with vaccine associated paralytic poliomyelitis. **Journal of Virology**, v. 68, n. 12, p. 8080-8101, dec. 1994.

GEORGESCU, M.M. et al. Mapping of mutations contributing to the temperature sensitivity of the sabin 1 vaccine strain of poliovirus. **Journal of Virology**, v. 69, n. 9, p. 5278-5286, sept. 1995a.

GEORGESCU, M.M.; DELPEYROUX, F.; CRANIC, R. Tripartite genome organization of a natural type 2 vaccine/nonvaccine recombinant poliovirus. **Journal of General Virology**, v.76, p. 2343-2348, 1995b.

GROMEIER, M. et al. Dual stem loops within the poliovirus internal ribosomal entry site control neurovirulence. **Journal of Virology**, v. 73, n. 2, p. 958-964, feb. 1999.

GUILLOT, S. et al. Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. **Journal of Virology**, v. 74, n. 18, p. 8434-8443, sept. 2000.

GUILLOT, S. et al. Point mutations involved in the attenuation/neurovirulence alternation in the type 1 e 2 oral polio vaccine strains detected by site-specific polymerase chain reaction. **Vaccine**, v.12, p. 503-507, 1994.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v.41, p. 95-98, 1999.

HALSEY, N.A. et al. Search for poliovirus carriers among people with primary immune deficiency diseases in the United States, Mexico, Brazil, and the United Kingdom. **Bulletin of the World Health Organization**, v.82, n. 1, p. 3-8, jan. 2004.

HARA, M. et al. Antigenic analysis of poliovirus isolated from a child with agammaglobulinemia and paralytic poliomyelitis after Sabin vaccine administration. **Microbiol. Immunol.**, v.25, p. 905-913, 1981.

HELLEN, C.U.T.; WIMMER, E. **Human Enterovirus Infections**: Enterovirus structure and assembly. American Society for Microbiology: Haley A. Rotbart: p.155-174. 1995.

HOGLE, J.M.; CHOW, M.; FILMAN, D. Three-dimensional structure of poliovirus at 2,9 Å resolution. **Science**, v.229, p. 1358-1365, 1985.

HORIE, H. et al. Analysis of the accumulation of mutants in sabin attenuation polio vaccine viruses passaged in Vero cells. **Vaccine**, v.19, p. 1456-1459, 2001.

HORIE, H. et al. Isolation of vaccine derived type 1 polioviruses displaying similar properties to virulent wild strain similar properties to virulent wild strain Mahoney from sewage in Japan. **Journal of Medical Virology**, v.68, p. 445-451, 2002.

HORIE, H. et al. Transgenic mice carrying the human poliovirus receptor: new animal model for study of poliovirus neurovirulence. **Journal of Virology**, v.68, p. 681-688, 1994.

HOVI, T. et al. Poliovirus surveillance by examining sewage specimens: quantitative recovery of virus after introduction into sewerage at remote upstream location. **Epidemiol. Infect.**, v.127, p. 101-106, 2001.

HOVI, T. et al. Outbreak of paralytic poliomyelitis in Finland: widespread circulation of antigenically altered poliovirus type 3 in a vaccinated population. **Lancet**, 1:1427-1432. 1986.

HYYPIA, T. et al. Classification of enterovirus based on molecular and biological properties. **Journal of General Virology**, v.78, p.1-11, 1997.

JAYKUS, L.A. Epidemiology and detection as option for control of viral and parasitic foodborne disease. **Emerging Infectious Disease**, v.3, p.529-539, 1997.

KAWAMURA, N. et al. Determinants in the 5' noncoding region of poliovirus Sabin 1 RNA that influence the attenuation phenotype. **Journal of Virology**, v.63, p. 1302–1309, 1989.

KEW, O.M. et al. Circulating vaccine-derived polioviruses: Current state of knowledge. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 82, n. 1, p.16-23, jan. 2004.

KEW, O.M. et al. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. **Science**, v. 296, p. 356-359, 2002.

KEW, O.M. et al. Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient child. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2893-2899, oct. 1998.

KEW, O.M. et al. Molecular epidemiology of poliovirus. **Seminars of Virology**, v.6, p. 401-414, 1995.

KEW, O.M. NOTTAY, B.K. **Modern approaches to vaccines:** Evolution of the oral poliovaccine strains in humans occur by both mutation and intramolecular recombination. New York: Cold Spring Harbor Press. 357-367, 1984

KHETSURIANI, N. et al. Persistence of vaccine derived polioviruses among immunodeficient persons with vaccine associated paralytic poliomyelitis. **Journal of Infectious Disease**, v.188, p. 1845-1852, 2003.

KILPATRICK, D.R. et al. Multiplex PCR method for identifying recombinant vaccine-related polioviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 4313-4315, sept. 2004.

KILPATRICK, D.R. et al. Serotype-specific identification of poliovirus by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residues at positions of codon degeneracy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 352-357, feb. 1998.

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

KING, A.M.Q. et al. Family *Picornaviridae*. In: **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses**. Seventh Report of International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Academic Press, p. 657-683. 2000.

KIRKEGAARD, K.; BALTIMORE, D. The mechanism of RNA recombination in poliovirus. **Cell**, v.47, p.433-443, 1986.

KITAMURA, N. et al. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. **Nature**, v.291, p. 547-553, 1981.

KOROTKOVA, E.A. et al. Retrospective analysis of a local cessation of vaccination against poliomyelitis: a possible scenario for the future. **Journal of Virology**, v. 77, n. 23, p. 12460-12465, dec. 2003.

LA MONICA, N.; RACANIELLO, V.R. Differences in replication of attenuated and neurovirulent polioviruses in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. **Journal of Virology**, v. 63, p. 2357-2360, 1989.

LA MONICA, N.; ALMOND, J.W.; RACANIELLO, V.R. A mouse model for poliovirus neurovirulence identifies mutations that attenuated the virus for humans. **Journal of Virology**, v. 61, n. 9, p. 2917-2920, 1987.

LEVY, J.A. et al. Picornaviridae. In: **Virology**. 3.ed. New Jersey: Prentice Hall, USA, 1994; 31-38. 1994.

LI, J.P. et al. Genetic basis of the neurovirulence of type 1 poliovirus isolated from vaccine-associated paralytic patients. **Achieves of Virology**, v.141, p. 1047-1054, 1996.

LI, J.P.; BALTIMORE, D. Isolation of poliovirus 2C mutants defective in viral RNA synthesis. **Journal of Virology**, v. 62, p. 4016-4021, 1988.

LIPSKAYA, G.Y. et al Frequent isolation of intertypic poliovirus recombinants with serotype 2 specificity from vaccine-associated polio cases. **Journal of Medical Virology**, v.35, p. 290-296, 1991.

LIU, H.M. et al. Molecular evolution of a type 1 wild-vaccine poliovirus recombinant during widespread circulation in China. **Journal of Virology**, v.74, n. 23, p. 11153-11161, 2000.

LU, Z. et al. Limited genetic changes in the sabin 1 strain of poliovirus occurring in the central nervous system of monkeys. **Journal of General Virology**, v.77, p. 273-280, 1996.

MACADAM, A.J. et al. The 5' noncoding region and virulence of poliovirus vaccine strains. **Trends Microbiol.**, v.2, p. 449-454, 1994.

MACADAM, A.J. et al Genetic basis of attenuation of the sabin type 2 vaccine strain of poliovirus in primates. **Virology**, v. 192, p. 18-26, 1993.

MACADAM, A.J. et al. Correlation of RNA secondary structure and attenuation of Sabin vaccine strains of poliovirus in tissue culture. **Virology**, v. 189, p. 415-422, 1992.

MACADAM, A.J. et al. The 5' noncoding region of the type 2 poliovirus vaccine strain contains determinants of attenuation and temperature sensitivity. **Virology**, v.181, p.451–458, 1991a.

MACADAM, A.J. et al. An assembly defect as a result of an attenuating mutation in the capsid proteins of the poliovirus type 3 vaccine strain. **Journal of Virology**, v.65, p. 5225-5231, 1991b.

MACADAM, A.J. et al. Reversion of the attenuated and temperature sensitive phenotypes of the sabin type 3 strain of poliovirus in vaccines. **Virology**, v.172, p. 408-414, 1989.

MANOR, Y. et al. Detection of poliovirus circulation by environmental surveillance in the absence of clinical cases in Israel and the Palestinian Authority. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p. 1670-1675, 1999.

MARTIN, J. et al. Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. **Journal of Virology**, v.76, n. 21, p. 10921-10928, nov. 2002.

MATSUURA, K. et al. Assessment of poliovirus eradication in Japan: genomic analysis of polioviruses isolated from river water and sewage in Toyama prefecture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n. 11, p. 5087-5091, nov. 2000.

McGOLDRICK, A. et al. Role of mutations G-480 and C-6203 in the attenuation phenotype of sabin type 1 poliovirus. **Journal of Virology**, v. 69, n. 12, p. 7601-7605, 1995.

MELNICK, J.L. Enterovirus: Poliovirus, Coxsachieviruses, Echoviruses and newer Enterovirus. In: IN: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. **Fields Virology**, 3 ed. New York: Lippincott-Raven Publishers, p.655-712, 1996.

MELNICK, J.L. et al. Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: Preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enterovirus. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 48, p. 263-268, 1973.

MENDELSON, C.L.; WIMMER, E.; RACANIELLO, V.R. Cellular receptor poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence and expression of a new member of the immunoglobulins superfamily. **Cell**, v.56, p. 855-865, 1989.

MÉTODOS de concentração de amostras de águas de esgoto. In: Normas Técnicas Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. 2001, p.16-19. (L5.505).

MEYER, K. et al. Interaction of eukaryotic initiation factor eIF-4B with a picornavirus internal translation initiation site. **Journal of Virology**, v.69, p. 2819-2824, 1995.

MINOR, P.D. Attenuation and reversion of the Sabin vaccine strains of poliovirus. **Develop. Biol. Stand.** 78:17-26. 1993.

MINOR, P.D. The temperature sensitivity of the Sabin type 3 vaccine strain of poliovirus: molecular and structural effects of a mutation in the capsid protein VP3. **Journal of General Virology**, 70: 1117-1123. 1989.

MINOR, P.D. et al. Genetic basis of attenuation of the Sabin oral poliovirus vaccines. **Biologicals**, v.21, p. 357-363, 1993

MINOR, P.D. The molecular biology of poliovaccines. **Journal of General Virology** v.73, p. 3065-3077, 1992.

MINOR, P.D. et al Antigenic structure of poliovirus of serotypes 1, 2 and 3. **Journal of General Virology**, v.67, p. 1283-1291, 1986.

MINOR, P.D.; DUNN, G. The effect of sequences in the 5' non-coding region on the replication of polioviruses in the human gut. **Journal of General Virology**, v. 69, p. 1091-1096, 1988.

MMWR (MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT). Laboratory surveillance for wild and vaccine derived polioviruses, january 2003-2004, v. 53, n. 42, p. 990-993, oct. 2004.

MMWR (MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT). Outbreak of poliomyelitis – Dominican republic and Haiti, 2000, 48, p.1094, 1103, 2002.

MMWR (MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT). Acute flaccid paralysis associated with circulating vaccine-derived poliovirus --- Philippines, 2001, v. 50, n. 40, p. 874-875, oct. 2001a.

MMWR (MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT). Circulation of a type 2 vaccine-derived poliovirus – Egypt, 1982-1993, v. 50, n. 3, p. 41-42, 51. jan. 2001b.

MMWR (MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT). Poliomyelitis prevention in the United States: Introduction of a sequential vaccination schedule of inactivated poliovirus vaccine followed by oral poliovirus vaccine recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP).

MODLIN, J.F. Poliomyelitis and poliovirus immunization. In: **Society for Microbiology** (ed. Haley A. Robart). p. 195-215, 1995.

MOORE, M.; MORENS, D.M. Enteroviruses, including polioviruses. In: **Textbook of Human Virology**. Belshe: PSG Publishing Company, USA, p. 407-483, 1984.

MOSS, E.G.; O'NEIL, R.E.; RACANIELLO, V.R. Mapping of attenuating sequences of an avirulent poliovirus type 2 strain. **Journal of Virology**, v.63, p. 1884-1890, 1989.

MS, 2005. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações. Campanha Nacional de Vacinação contra a Poliomielite – 2005 (<http://www.saude.gov.br/svs>)  
MS, 2006. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sociedade Brasileira de Pediatria. (<http://www.sbp.com.br>)

MULDERS, M.N. et al. A sabin vaccine derived field isolated of poliovirus type 1 displaying aberrant phenotypic and genetic features, including a deletion in antigenic site 1. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 907-916, 1999.

MUZYCHENKO, A.R. et al. Coupled mutations in the 5'-unstralated region of sabin poliovirus strains during in vivo passages: structural and functional implications. **Virus Research**, v. 21, p. 111-122, 1991.

NKOWANE, B. et al. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis. United States: 1973 through 1984. **Journal of American Medical Association**, v.257, p. 1335–1340, 1987.

NOMOTO, A. et al. Complete nucleotide sequence of the attenuated poliovirus Sabin 1 strain genome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.79, p. 5793-5797, 1982.

NORDER, H. et al. Sequency of “untypable” Enterovirus reveals two news types, EV-77 and EV-78, within human Enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types. **Journal of General Virology**, v.84, p. 827-836, 2003.

OBERSTE, M. S. et al. Enterovirus 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species human enterovirus A. **Journal General Virology**, v.86, p.445-451, 2005.

OBERSTE, M. S. et al. A molecular identification and characterization of two proposed Enterovirus serotypes EV 73 and EV 74. **Journal of General Virology**, 85: 3205-3212. 2004.

OBERSTE, M.S. et al. Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. **Journal of General Virology**, v.82, p. 409-416, 2001.

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

OBERSTE, M. S. et al. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. **Journal of Virology**, v. 73, n. 3, p. 1941-1948, 1999a.

OBERSTE, M. S. et al. Typing of human enterovirus by partial sequencing of VP1. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1288-1293, 1999b.

OBERSTE, M.S.; MAHER, K.; PALLANSCH, M.A. Molecular phylogeny and proposed classification of the simian picornaviruses. **Journal of Virology**, v.76, n. 3, p. 1244-1251, 2002.

OMATA, T. et al. Genetic analysis of the attenuation phenotype of poliovirus type 1. **Journal of Virology**, v.58, p. 348-358, 1986.

OTELEA, D. et al. Genomic modifications in naturally occurring neurovirulent revertants of Sabin 1 polioviruses. **Dev. Biol. Stand.** v.78, p. 33-38, 1993.

PAHO (Pan American Health Organization). Polio Eradication Field Guide, 2<sup>nd</sup> ed, 9-11, 1994.

PALLANSCH, M.A.; ROSS, R. Enterovirus: Poliovirus, Coxsachieviruses, Echoviruses and newer Enterovirus. In: IN: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. **Fields Virology**, 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.723-775, 2001.

PATRIARCA, P.A.; SUTTER, R.W.; OOSTVOGEL, P.M. Outbreaks of paralytic poliomyelitis, 1976-1995. **Journal of Infectious Diseases**, v.175, S1, p.S165-172, 1997.

PAUL, J.R. History of Poliomyelitis. Yale University Press, New Haven, Conn. 1971.

PILIPENKO, E.V. et al Prokaryotic-like cis elements in the cap-independent internal initiation on picornavirus RNA. **Cell**, v.68, p. 119-131, 1992.

PILIPENKO, E.V. et al. Conserved structural domains in the 5'-unstralated region of picornaviral genomes: an analysis of the segment controlling translation and neurovirulence. **Virology**, v.168, p. 201-209, 1989.

POLLARD, S.R. et al. Nucleotide sequence of a neurovirulence variant of the type 2 oral poliovirus vaccine. **Journal of Virology**, v.63, n. 11, p. 4949-4951, nov. 1989.

PORTER, A.G. Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. **Journal of Virology**, v.67, p. 6917-6921, 1993.

PRINGLE, C.R. Virus taxonomy at the XI<sup>th</sup> International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. **Archives of Virology**, v.144, p. 2065-2070, 1999.

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

RACANIELLO, V. R. Infectious cDNA, cell receptors and transgenic mice in the study of sabin's poliovirus vaccine. **Biologicals**, v.21, p.365-369, 1993.

RACANIELLO, V. R. Poliovirus neurovirulence. **Advances in Virus Research**, v.34, p. 217-246, 1988.

RACANIELLO, V. R.; BALTIMORE, D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. **Science**, v.214, p.916-919, 1981a.

RACANIELLO, V. R; BALTIMORE, D. Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.78, p. 4887-4891, 1981b.

REN, R. et al. Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. **Cell**, v.63, p. 353-362, 1990.

REN, R.; MOSS, E.G.; RACANIELLO, V.R. Identification of two determinants that attenuate vaccine related type 2 poliovirus. **Journal of Virology**, v.65, n. 3, p. 1377-1382, 1991.

REZAPKIN, G.V. et al Mutations in sabin 2 strain of poliovirus and stability of attenuation phenotype. **Virology**, v. 258, p. 152-160, 1999.

REZAPKIN, G.V. et al. Genetic stability of sabin 1 strain of poliovirus: implications for quality control of oral poliovirus vaccine. **Virology**, v. 245, p. 183-187, 1998.

REZAPKIN, G.V. et al. Microevolution of type 3 Sabin strain of poliovirus in cell cultures and its implications for oral poliovirus vaccine quality control. **Virology**, v. 211, p. 377-384, 1995.

REZAPKIN, G.V. et al. Microevolution of sabin 1 strain in vitro and genetic stability of oral poliovirus vaccine. **Virology**, v. 202, p. 370-378, 1994.

RIVERA, V.M.; WELSH, D.; MAIZEL, J.V. Jr. Comparative sequence analysis of the 5' noncoding region of the enterovirus and rhinovirus. **Virology**, v.165, p. 42-50, 1988.

ROUSSET, D. et al. Recombination vaccine-derived poliovirus in Madagascar. **Emerg Infect Diseases**, v.9, n. 7, p. 885-887, jul. 2003.

RUECKERT, R.R. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Fields Virology, 1, 609-654. Third edition. New York. Lippincott-Raven Publishers. 1996.

SABIN, A.B. Oral poliovirus vaccine: History of its development and use and current challenge to eliminated poliomyelitis from the world. **Journal of Infectious Diseases**, v. 151, n. 3, p. 420-436, 1985.

SABIN, A.B. Immunization. **Journal of the American Medical Association**, v. 246, n.3, 1981.

SABIN, A.B. Oral poliovirus vaccine: History of its development and prospects for eradication of poliomyelitis. **Journal of the American Medical Association**, v .194, n.8, 1965.

SABIN, A.B. Properties and behavior of orally administered attenuated poliovirus vaccine. **Journal of the American Medical Association**, v. 164, p.1216-1223, 1957.

SABIN, A.B.; BOULGER, L.R. History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains. **Journal of Biological Standardization**, v.1, p. 115-118, 1973.

SALK, J.E. Considerations in the preparation and use of poliomyelitis virus vaccine. **Journal of the American Medical Association**, v.158, p.1239-1248, 1955.

SANTTI, J.; VAINIOPAA, R.; HYYPIA, T. Molecular detection and typing of human picornaviruses. **Virus Research**. 62, p.177-183, 1999.

SAVILAHTI, E. et al. Inadequacy of mucosal IgM antibodies in selective IgA deficiency: excretion of attenuated polioviruses is prolonged. **Journal of Clinical Immunology**, v.8, p. 89-94, 1988.

SEDMAK, G.; BINA, D.; MACDONALD, J. Assessment of an enterovirus sewage surveillance system by comparison of clinical isolates with sewage isolates from Milwaukee, Wisconsin, collected august 1994 to December 2002. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n. 12, p. 7181- 7187, dec. 2003.

SHIMIZU, H. et al. Circulation of type 1 vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. **Journal of Virology**, v.78, n. 24, p. 13512-13521, dec. 2004.

SHULMAN, L.M. et al. Resolution of the pathway of poliovirus type 1 transmission during an outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n. 3, p. 945-952, mar. 2000a.

SHULMAN, L.M. et al. Molecular and antigenic characterization of a highly evolved derivative of the type 2 oral poliovaccine strain isolated from sewage in Israel. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n. 10, p. 3729-3734, oct. 2000b.

SKINNER, M.A. et al. New model for the secondary structure of the 5' non-coding RNA poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence. **Journal of Molecular Biology**, v.207, p. 379-392, 1989.

STANWAY, G. et al Comparison of the nucleotide sequences of the genomes of the neurovirulent poliovirus P3/Leon/37 and this attenuated Sabin vaccine derivated P3/Leon 12a1b. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.81, p.1539-1543, 1984.

STANWAY, G. Structure, function and evolution of picornaviruses. **Journal of General Virology**, v.71, p. 2483-2501, 1990.

SUTTER, R.W.; PREVOTS, D.R. Vaccine associated paralytic poliomyelitis among immunodeficient persons. **Infect. Med.**, v. 11, p. 426, 429-30, 435-438, 1994.

SVITKIN, Y.V. et al. Translation deficiency of the Sabin type 3 poliovirus genome: association with an attenuating mutation C-472-U. **Virology**, v.175, p. 103-109, 1990.

SVITKIN, Y.V. et al. Point mutations modify the response of poliovirus RNA to a translation initiation factor: a comparison of the neurovirulent and the attenuated strains. **Virology**, v.166, p. 394-404, 1988.

SVITKIN, Y.V.; MASLOVA, S.V.; AGOL, V.I. The genomes of attenuated and virulent poliovirus strains differ in the in vitro translation efficiencies. **Virology**, v.147, p. 243-252, 1985.

TAFFS, R.E. et al. Genetic stability and mutant selection in Sabin 2 strain of oral poliovirus vaccine grown under different cell culture conditions. **Virology**, v. 209, p. 366-373, 1995.

TARDY-PANIT, M. et al. A mutation in the RNA polymerase of poliovirus type 1 contributes to attenuation in mice. **Journal of Virology**, v. 67, n. 8, p. 4630-4638, aug. 1993.

TATEM, J.M. et al. A mutation present in the amino terminus of Sabin 3 poliovirus VP1 protein is attenuating. **Journal of Virology**, v. 66, n. 5, p. 3194-3197, 1992.

TATEM, J.M. et al. Oral poliovirus vaccine in the United States: molecular characterization of Sabin 3 poliovirus after replication in the gut of vaccines. **Journal of Medical Virology**, v.35, p. 101-109. 1991.

TOYODA, H. et al. Complete nucleotide sequences of all three poliovirus serotype genomes. Implication for genetic relationship, gene function and antigenic determinants. **Journal of Molecular Biology**, v.174, p. 561-585, 1984.

VINJÉ, J. et al. Isolation and characterization of circulation type 1 vaccine-derived poliovirus from sewage and stream waters in Hispaniola. **Journal of Infectious Disease**, v.189, p. 1168-1175, 2004.

WATSON, J.D. et al RNA viruses. In: **Molecular Biology of the Gene**. 4.ed., New York: Cummings Publishing Company; v.2, p. 910-915, 1987.

WEEKS-LEVY, C. et al. Identification and characterization of a new base substitution in the vaccine strain of Sabin 3 poliovirus. **Virology**, v.185, p. 934-937, 1991.

WESTROP, G.D. et al. Genetic basis of attenuation of the Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. **Journal of Virology**, v. 63, n. 3, p. 1338–1344, 1989.

WHITE, D.O.; FENNER, F.J. Picornaviridae. In: **Medical Virology** (ed. David O. White & Frank J. Fenner) Academic Press, p. 382-406, 1994.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Inactivated poliovirus vaccine following oral poliovirus vaccine cessation. **Weekly Epidemiological record**, v.15, p.137-144, 2006.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Laboratory surveillance for wild and vaccine-derived polioviruses, January 2004-June 2005. **Weekly Epidemiological record**, v.39, n. 16, p. 335-340, 2005.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Polio Laboratory Manual**, Geneva. 2004. 157p.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Conclusion and recommendations: WHO informal consultation on identification and management of vaccine-derived polioviruses. Geneva. 2003.

WIMMER, E. Seminars in Virology, 8. Academic Press, Oxford, England. 1997.

WIMMER, E.; HELLEN, C.U.T.; CAO, X. Genetic of poliovirus. **Annu. Rev. Genetic**, v.27, p. 353-436, 1993.

WOOD, D.J.; MACADAM, A.J. Laboratory tests for live attenuated poliovirus vaccines. **Biologicals**, v.25, p. 3-15, 1997.

WOOD, D.J.; SUTTER, R.W.; DOWDLE, W.R. Stopping poliovirus vaccination after eradication: issues and challenges. **Bulletin of the World Health Organization**, v.78, n. 3, p. 347-57, 2000.

WRIGHT, P.F. et al. Strategies for the global eradication of poliomyelitis by the year 2000. **New England Journal of Medicine**, v.325, p. 1774-1779, 1991.

YANG, C.F. et al. Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. **Journal of Virology**, v.77, n. 15, p. 8366-8377, aug. 2003.

YOSHIDA, H. et al. Prevalence of vaccine-derived polioviruses in the environment. **Journal of Virology**, v. 83, p. 1107-1111, 2002.

YOSHIDA, H. et al. Characterization of vaccine-derived polioviruses isolated from sewage and river water in Japan. **The Lancet**, v. 356, n.28, p. 1461-1463, oct. 2000.

