

# Isolamento e identificação molecular dos enterovírus não pólio em casos de paralisia flácida aguda, ocorridos na Região Norte do Brasil, no período de 1996 a 2006

Isolation and molecular identification of enteroviruses in cases of non-polio acute flaccid paralysis, occurred in Northern Brazil from 1996 to 2006

Aislamiento e identificación molecular de los enterovirus no polio en casos de parálisis fláccida aguda, ocurridos en la Región Norte de Brasil, en el período de 1996 a 2006

Jainara Cristina dos Santos Alves  
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,  
Pará, Brasil

Darleise de Souza Oliveira  
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,  
Pará, Brasil

Ana Lucia Monteiro Wanzeller  
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,  
Pará, Brasil

Alexandre da Costa Linhares  
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,  
Pará, Brasil

Edna da Silveira  
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,  
Pará, Brasil

Maria de Lourdes Contente Gomes  
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,  
Pará, Brasil

Antonia dos Santos Alves  
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,  
Pará, Brasil

Ceyla Maria Oeiras de Castro  
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,  
Pará, Brasil

Euda Galiza Primo  
Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua,  
Pará, Brasil

## RESUMO

Os enterovírus (EV) de origem humana pertencem à família *Picornaviridae*, possuem 30 nm de diâmetro, genoma de RNA de fita simples, sua transmissão é de via fecal-oral e têm sido relacionados a surtos de diversas doenças do sistema nervoso central. O estudo objetivou identificar a presença de enterovírus não pólio (EVNP) isolados de casos de paralisia flácida aguda (PFA). Linhagens celulares HEp-2C e RD que apresentaram efeito citopático foram selecionadas para testes moleculares posteriores. O RNA viral foi extraído utilizando-se o *kit* QIAamp Viral RNA. Os iniciadores 222 e 292, os quais amplificam parte da região VP1 do genoma dos EV, foram usados na técnica de reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) para a detecção molecular viral, produzindo um amplicon de 356 nucleotídeos. Entre os anos de 1996 a 2006, 538 amostras fecais de casos suspeitos de PFA, provenientes de toda a Região Norte do Brasil, foram encaminhadas ao Instituto Evandro Chagas. Deste total, 78 (14,5%; 78/538) apresentaram efeito citopático nas duas linhagens celulares. Posteriormente, 51 (65,4%; 51/78) foram positivas por RT-PCR. Os casos positivos de EV foram detectados nos Estados do Amazonas (14/51; 27,4%), Amapá (13/51; 25,5%), Pará (11/51; 21,6%), Rondônia (10/51; 19,6%) e Tocantins (3/51; 5,9%). A identificação por sequenciamento genômico foi possível em 40 amostras. Echovírus (20 casos, nove sorotipos) e coxsackievírus (dez casos, três sorotipos) foram as espécies predominantes encontradas. Os resultados deste estudo corroboram outros realizados no Brasil e no mundo, e servem de base para o melhor entendimento da epidemiologia molecular dos EV circulantes na Região Amazônica e a associação de seus diversos sorotipos com casos de doenças neurológicas.

**Palavras-chave:** Enterovírus Não-Pólio; Identificação Molecular; Infecções por Coxsackievirus; Echovirus; Amazônia.

### Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Jainara Cristina dos Santos Alves  
Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia,  
Laboratório de Enterovírus  
Rod. BR 316, Km 7, s/n°. Bairro: Levilândia  
CEP: 67030-070 Ananindeua-Pará-Brasil  
Tel.: (91) 3214-2018  
E-mail: jainaraalves@iec.pa.gov.br

## INTRODUÇÃO

Os enterovírus (EV) (família *Picornaviridae*) são diversificados em vários (soro)tipos. A atual classificação do gênero *Enterovirus*, com base em dados biológicos e em resultados de análise moleculares do genoma completo viral, agrupa os EV em 12 espécies (Tabela 1)<sup>1</sup>.

São os patógenos mais comuns que infectam seres humanos, especialmente crianças, em todo o mundo. A maioria das infecções é assintomática, mas também pode levar a doenças graves. Estes vírus replicam-se no trato gastrointestinal, causam infecções sistêmicas, com manifestações que incluem pancreatite, miocardite, miosites, meningite, encefalite, herpangina, pleurodinia, exantema e várias outras doenças que podem infectar o sistema nervoso central, resultando em quadro de paralisia/paresia flácida aguda (PFA).

Esses vírus permanecem presentes por um longo tempo em esgotos, fezes, água e também nas mãos, favorecendo sua transmissão que é via fecal-oral, podendo também ser veiculado por aerossóis, mesmo em regiões com boas condições sanitárias<sup>2</sup>.

Um estudo ocorrido no Estado do Pará, Brasil, no período de 1961 a 1984, relatou o isolamento de 188 enterovírus não pólio (EVNP) de casos de paralisia e/ou paresia de membros, neste estudo foram identificados 18 sorotipos. Os mais isolados foram Echo 19, 11, 13 e Cox A4<sup>3</sup>. Em outro trabalho realizado também por Gomes et al<sup>4</sup>, envolvendo 468 amostras de casos de PFA recebidas no Instituto Evandro Chagas (IEC), Ananindeua, Pará, no período de 1998 a 2000, 71 (15,2%) foram positivas pelo cultivo celular e reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR), sendo que 53 (74,6%) foram identificadas e 18 (25,4%) não.

**Tabela 1** – Classificação do gênero *Enterovirus* com base na análise do genoma viral

Espécies de <i>Enterovirus</i>											
(EV-A)	(EV-B)	(EV-C)	(EV-D)	(EV-E)	(EV-F)	(EV-G)	(EV-H)	(EV-J)	(RV-A)	(RV-B)	(RV-C)
CV-A2-A8	CV-B1-B6	PV-1	EV-D68	EV-E1	EV-F1	EV-G1	EV-H1	SV6	RV-A1-A2	RV-B3-B6	HRV-C1-C53
CV-A10	CV-A9	PV-2	EV-D70	EV-E2	EV-F2	EV-G2		EV-J103	RV-A7-A13	RV-B14	
CV-A12	E-1-7	PV-3	EV-D94	EV-E3	EV-F3	EV-G3		EV-J108	RV-A15-A16	RV-B17	
CV-A14	E-9	CV-A1	EV-D111	EV-E4	EV-F4	EV-G4		EV-J112	RV-A18-A25	RV-B26-B27	
CV-A16	E-11-21	CV-A11	EV-D120		EV-F5	EV-G5		EV-J115	RV-A28-A34	RV-B35	
EV-A71	E-24-27	CV-A13			EV-F6	EV-G6		EV-J121	RV-A36	RV-B37	
EV-A76	E-29-33	CV-A17				EV-G7			RV-A38-A41	RV-B42	
EV-A89	EV-B69	CV-A19-A22				EV-G8			RV-A43	RV-B48	
EV-A90	EV-B73	CV-A24				EV-G9			RV-A45-A47	RV-B52	
EV-A91	EV-B74	EV-C95-C96				EV-G10			RV-A49-A51	RV-B69-B70	
EV-A92	EV-B75	EV-C99				EV-G11			RV-A53-A68	RV-B72	
EV-A114	EV-B77-B88	EV-C102							RV-A71	RV-B79	
EV-A119	EV-B93	EV-C104-C105							RV-A73-A78	RV-B83-B84	
EV-A120	EV-B97-B98	EV-C109							RV-A80-A82	RV-B86	
SV19	EV-B100-B101	EV-C113							RV-A85	RV-B91-B93	
SV43	EV-B106-B107	EV-C116-C118							RV-A88-A90	RV-B97	
SV46	EV-B110								RV-A94	RV-B99-B106	
BA13	EV-B111								RV-A96		
	SA5								RV-A100-A109		

EV – *Enterovirus*; RV – *Rhinovirus*. Os *Rhinovirus* C (RV-C) são também denominados de HRV-A2 ou HRV-C ou HRV-X; CV – *Coxsackievirus*; E – *Echovirus*; PV – *Poliovirus*.

Fonte: <http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>

Uma avaliação dos achados clínicos e epidemiológicos de casos de PFA associados a EVNP ocorridos nas Américas no período de 1989 a 1991 refere que das 4.986 amostras de fezes examinadas, os EVNP estavam presentes em 902 (18,1%), apontando maior relação com a síndrome de Guillain Barré (334/838 isolados – 40%); contudo, uma proporção consubstancial de diagnósticos foi listada como "desconhecida" (23%) ou "outra"<sup>5</sup>. Nos anos de 2000 e 2001, vários sorotipos de EVNP foram identificados em 186 isolados de 138 crianças com PFA residentes na República Democrática do Congo. Dentre esses materiais foram detectados dois novos tipos de EV, considerando a divergência  $\geq 28\%$  na sequência de aminoácidos da região VP1. Esses EV foram designados como EV-93, pertencente ao EVH-B, e EV-94, ao EVH-D<sup>6</sup>.

A ocorrência de casos de PFA em território brasileiro é estudada atualmente nos laboratórios de EV de duas instituições de pesquisa, sendo uma delas o IEC, vinculado à Secretaria de Vigilância em Saúde, para onde são enviadas as amostras de casos ocorridos na Região Norte e em dois Estados da Região Nordeste (Maranhão e Piauí), e para o Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, responsável pelas pesquisas das demais federações do Brasil.

A vigilância das PFA é de grande importância no âmbito nacional e internacional para atender às necessidades de emergência em casos de surtos epidêmicos provocados por EV, principalmente no que diz respeito à poliomielite.

Este projeto teve por objetivo a identificação de EVNP isolados de casos de PFA ocorridos na Região Norte do Brasil no período de janeiro de 1996 a dezembro de 2006.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### ESPÉCIMES

Neste estudo foram utilizados 78 sobrenadantes de culturas celulares positivas anteriormente para EVNP. Com os objetivos de averiguar a viabilidade destas amostras e subsequentemente aumentar a titulação viral das mesmas, todas as 78 amostras foram reinoculadas em linhagens RD (rabdomyosarcoma embrionário humano) e HEp-2C (carcinoma epidermoide de laringe humana), 64 apresentaram ECP (efeito citopático) e 14 sem efeito ECP; e, adicionalmente, para as 14 amostras que não apresentaram ECP, novas suspensões fecais foram feitas e inoculadas em ambas as linhagens. As amostras deste estudo foram todas oriundas de casos de deficiência motora aguda e flácida (DMAF) e PFA ocorridos na Região Norte do Brasil no período de 1996 a 2006.

### PREPARO DE SUSPENSÃO FECAL

As suspensões fecais foram preparadas de acordo com o Manual de Pólio da Organização Mundial de Saúde<sup>7</sup>. Dois gramas de fezes foram misturados a 8 mL de solução tampão (PBS), contendo antibióticos (penicilina e estreptomicina), 2 mL de

clorofórmio e 1 g de pérolas de vidro de 3 mm de diâmetro. Essa mistura foi agitada vigorosamente por 20 min e depois centrifugada a 4.000 rpm durante 20 min a 4° C. O sobrenadante foi separado e inoculado em cultivos celulares.

### ISOLAMENTO VIRAL

As suspensões fecais e os fluidos celulares foram inoculados em células HEp-2C e RD com dois dias de crescimento. Seguiu-se um período de observação microscópica de cinco dias (primeira passagem) e mais cinco (segunda passagem), perfazendo um total de dez dias para a visualização do ECP. Os fluidos positivos foram congelados a -20° C e os negativos (sem ECP) foram submetidos a três ciclos de congelamento em gelo seco/descongelamento a 37° C, objetivando a ruptura das células e assim liberando partículas virais possivelmente presentes, para posterior reinoculação em cultivo celular (segunda passagem). Para confirmar o ECP foram realizadas etapas de extração do RNA e RT-PCR.

### EXTRAÇÃO DO RNA

O RNA foi extraído utilizando-se o *kit* QIAamp Viral RNA (QIAGEN, Valencia, CA, USA). O procedimento foi realizado de acordo com as orientações do fabricante. Um volume de 140  $\mu$ L da amostra foi adicionado a 560  $\mu$ L do tampão de lise (AVL/Carrier RNA), seguindo-se de homogeneização vigorosa em vortex durante 15 s. Para o rompimento da partícula viral por completo, percorreu-se um período de 10 min à temperatura ambiente (TA) e, em seguida, a centrifugação para baixar gotas existentes na tampa. Após essa centrifugação, foram adicionados 560  $\mu$ L de etanol (96-100%), posteriormente a homogeneização em vortex por 15 s e, novamente, a centrifugação para baixar gotas existentes na tampa. Cuidadosamente foram aplicados 630  $\mu$ L dessa solução em uma coluna com membrana de sílica para adsorção do RNA viral e a centrifugação a 8.000 rpm por 1 min. Esta etapa foi repetida mais uma vez. Foram realizadas ainda duas etapas de lavagem usando-se dois diferentes tampões: AW1 (500  $\mu$ L) com centrifugação a 8.000 rpm por 1 min e AW2 (500  $\mu$ L) com centrifugação a 14.000 rpm por 3 min. As condições de lavagem asseguraram a purificação do RNA e a remoção de resíduos (proteínas e outros contaminantes). A última etapa consistiu da eluição do RNA: cuidadosamente, a coluna foi transferida para um tubo estéril (livre de DNase e RNase) e adicionado 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril pré-aquecida no centro da membrana. Após 1 min em TA e centrifugação (8.000 rpm por 1 min), o RNA foi conservado a -20° C até a utilização no teste de RT-PCR.

### RT-PCR

Para amplificação do genoma foram usados os oligonucleotídeos 222 e 292 específicos de gênero e descritos por Oberste et al<sup>8</sup>. Esses oligonucleotídeos hibridizam na região VP1 produzindo amplicons de aproximadamente 356 pares de bases (pb). A reação continha 3  $\mu$ L do RNA extraído do tampão,

50 pmol de cada oligonucleotídeo, 2 mM de cada dNTP, 10 U de Inibidor de RNase, 100 mM de dithiothreitol, 60 U de transcriptase reversa e 5 U de taq polimerase no volume final de 50 µL. A mistura foi incubada a 50° C por 30 min e 94° C por 3 min para inativar a transcriptase reversa. A mistura foi submetida a 35 ciclos subsequentes de desnaturação (94° C, 30 s), hibridização (42° C, 30 s) e extensão (60° C, 30 s). Todos os produtos da RT-PCR foram conservados a 4° C e, em seguida, aplicados em gel de agarose a 1,5% em tampão tris-borato-EDTA (TBE) adicionado de brometo de etídio. Após eletroforese de aproximadamente 1 h a 90 volts, finalizando-se com a etapa de visualização e fotografia dos DNAs utilizando o sistema Gel Doc 1000.

### SEQUENCIAMENTO GENÔMICO

Para a purificação dos produtos da RT-PCR, seguiu-se o protocolo do *kit* PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen Carlsbad, CA, EUA) conforme as orientações do fabricante.

Um volume de 320 µL do tampão de ligação foi adicionado a 80 µL de isopropanol, seguindo-se de agitação vigorosa em vortex. Essa mistura foi adicionada diretamente sobre uma membrana de sílica existente no interior da coluna de purificação, dentro de um tubo de lavagem de 2 mL e centrifugada a 12.000 rpm por 1 min, sendo o líquido eluente completamente descartado. Na etapa seguinte, adicionou-se à membrana 650 µL do tampão de lavagem contendo etanol, dando início a uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 1 min. O líquido eluente foi descartado e se fez outra centrifugação (12.000 rpm por 1 min) para remover resíduos de etanol. A última etapa consistiu em retirar a coluna do interior do tubo de lavagem, colocando-a em um tubo de 1,5 mL, adicionando-se 50 µL de água destilada pré-aquecida, diretamente no centro da membrana. Após 1 min em TA e centrifugação (12.000 rpm por 2 min), o DNA eluído (purificado) foi estocado a -20° C e usado para posterior sequenciamento.

Na reação de sequenciamento foi utilizado o *kit* BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e os produtos foram analisados no sequenciador automático ABI Prism 3130XL DNA Sequencer. A reação continha produto de PCR (30-90 ng), Terminator Ready Reaction mix, tampão TS, oligonucleotídeo (3,2 pmol) água e um volume final de 20 µL. As amostras foram submetidas a 25 ciclos subsequentes de desnaturação (96° C, 10 s), hibridização (50° C, 5 s) e extensão (60° C, 4 s). Após essas reações os produtos foram purificados por precipitação com isopropanol/etanol de acordo com o protocolo sugerido no manual do *kit* BigDye®. Para cada 20 µL de reação de sequenciamento foram adicionados 80 µL de isopropanol 75% (preparado na hora), seguido de uma rápida agitação (vortex) e 20 min à TA. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 25 min a 4° C, e todo líquido sobrenadante

aspirado cuidadosamente para não remover o DNA precipitado. Foi adicionado 200 µL de etanol a 70% (preparado na hora) e rápida agitação e centrifugação a 13.000 rpm por 6 min a 4° C. Novamente, todo líquido foi descartado, removendo-se qualquer traço de etanol. As amostras foram totalmente secas a vácuo, ressuspensas em 10 µL de formamida e desnaturadas por 5 min a 95° C antes de serem submetidas à eletroforese no sequenciador.

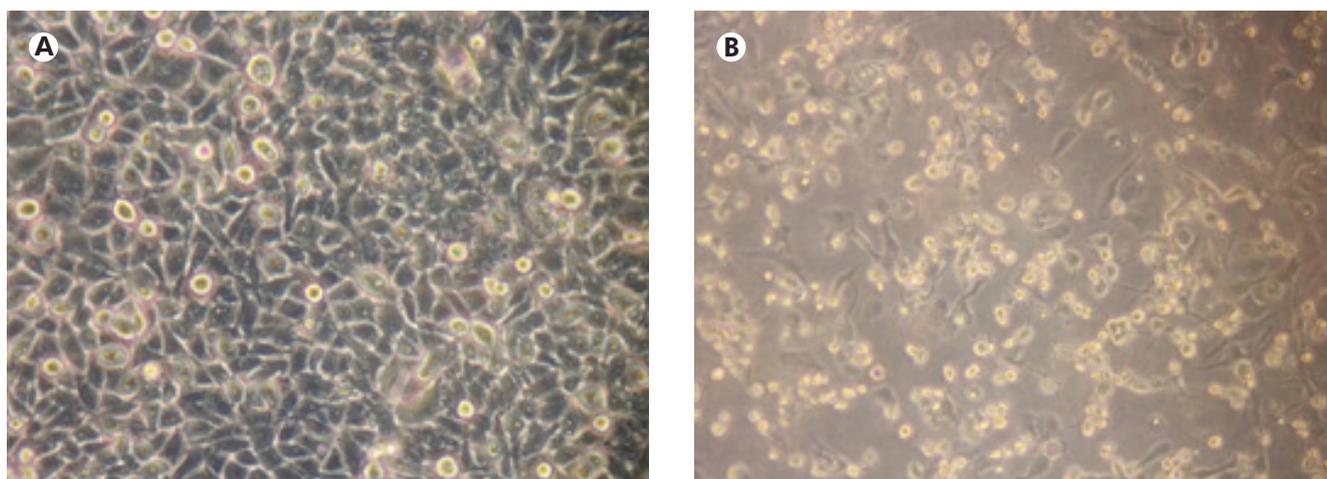
### ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS

As sequências nucleotídicas foram editadas e alinhadas com o programa BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.5.2) e comparadas com protótipos disponíveis no GenBank (National Center for Biotechnology Information, USA [www.ncbi.nlm.nih.gov]), usando o aplicativo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) e submetidas à análise filogenética no programa MEGA3 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)<sup>9</sup>. A distância genética entre as sequências foi calculada pelo algoritmo Neighbor-joining, com base no método de Kimura 2-parâmetros para nucleotídeos<sup>10</sup>. O cálculo da robustez do dendrograma gerado foi realizado pelo método de Bootstrap com 2 mil réplicas<sup>11</sup>.

### RESULTADOS

No período de janeiro de 1996 a dezembro de 2006, foram recebidas no IEC 538 amostras fecais de casos suspeitos de PFA, oriundas da Região Norte do Brasil. Destas, 78 (14,5%) foram positivas para EV, com 64 amostras apresentando ECP e 14 sem efeito morfológico.

Para essas 14 amostras foram feitas novas suspensões fecais e inoculadas em cultivos celulares RD e HEp-2C, mas as amostras continuaram sem ECP (Figura 1). Utilizando a técnica de RT-PCR, obteve-se positividade de 51 amostras com amplicons de aproximadamente 356 pb (Figura 2). A distribuição das amostras (positivas/total) por Estado foi: Acre (1/27 – 3,7%); Amapá (12/36 – 33,3%); Amazonas (22/164 – 13,4%); Pará (27/170 – 15,9%); Rondônia (11/76 – 14,5%); Tocantins (5/51 – 9,8%) (Figura 3). As amostras reinoculadas e com positividade na RT-PCR, por Estado foram: Amapá 12 reinoculadas/12 positivas; Amazonas 20/15; Pará 17/11; Rondônia 12/10; Tocantins 3/3. No Estado de Roraima não houve casos positivos no período estudado e não foi possível trabalhar com a amostra do Estado do Acre. As amostras foram submetidas ao sequenciamento genômico parcial da região VP1 e 40 foram identificadas, sendo 20 como *Echovirus* (Echo), dez *Coxsackievirus*, (Cox) e dez *Enterovirus* (Tabela 2). A faixa etária de 1 a 5 anos de idade foi a mais acometida, não havendo distinção no número de casos entre gêneros. Nas análises comparativas das sequências nucleotídicas, duas amostras de Echo 11 deste estudo apresentaram percentuais de diferença que variaram de 23,9-24,2% quando comparadas ao protótipo de Echo 11 (USA/CA53-Gregory). Essas amostras agruparam-se no genótipo C e o protótipo no genótipo B. O percentual de homologia nucleotídica foi de 100% entre as duas amostras de Echo 11 (Figura 4).



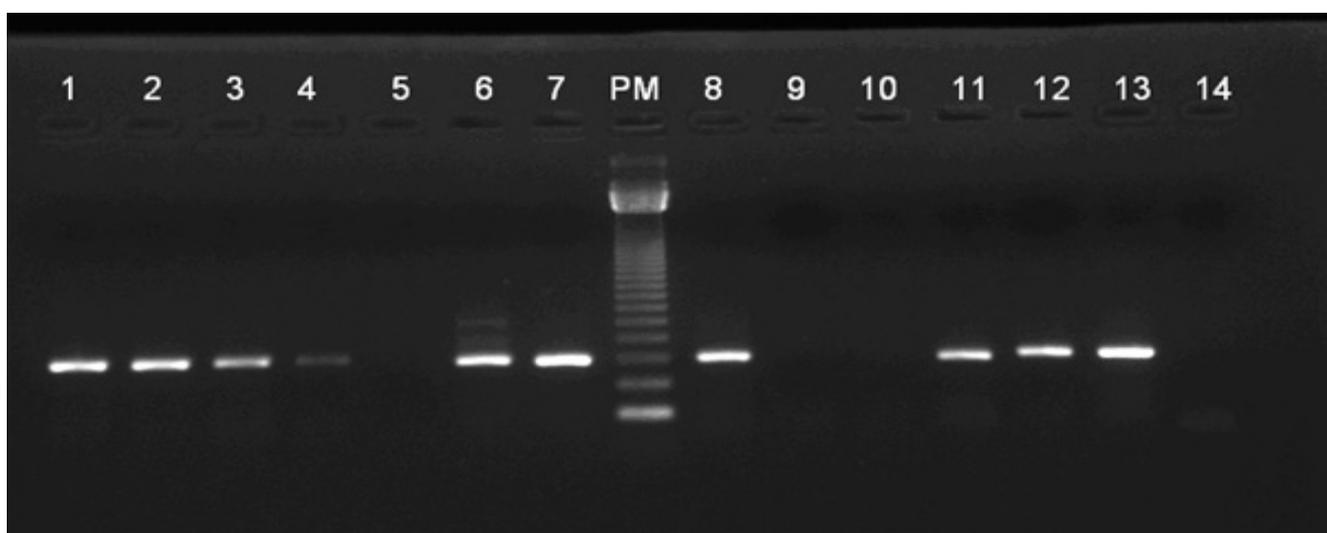
Linhagem HEp-2C não infectada

Linhagem HEp-2C infectada

A: Linhagem não infectada (Controle); B: Linhagem infectada, evidenciando efeito citopático cinco dias após a inoculação da suspensão fecal.

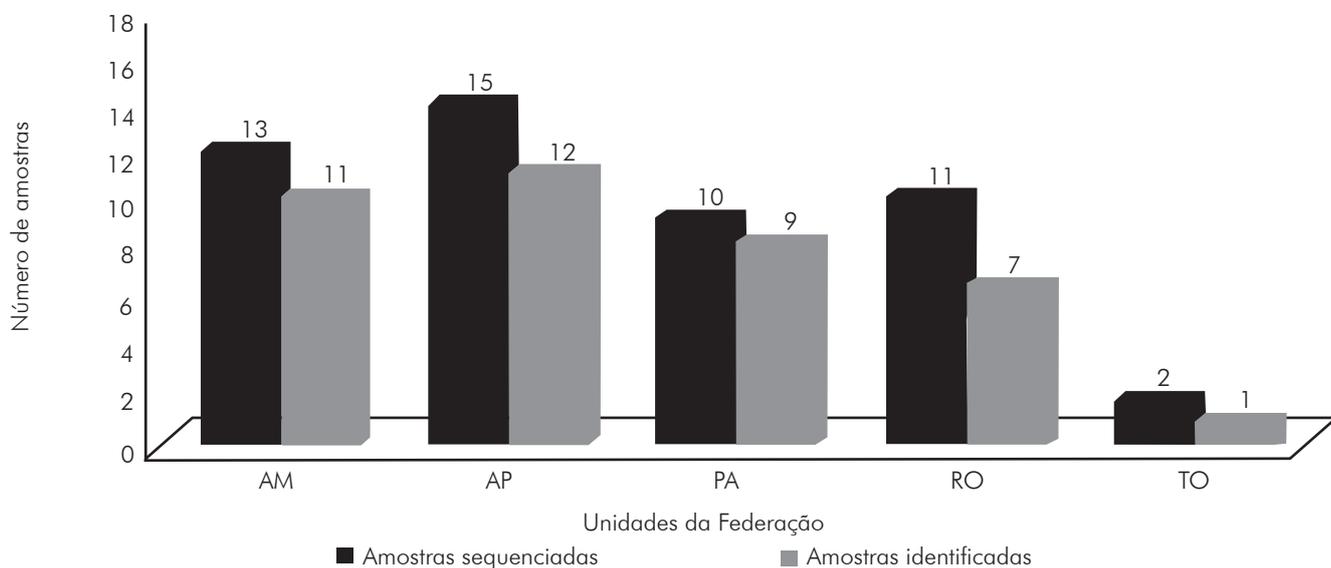
Fonte: Laboratório de Enterovírus, Seção de Virologia, IEC/SVS/MS.

**Figura 1** – Imagens da linhagem celular HEp-2C



Linhas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 11, 12: positivos; Linhas 5, 9, 10: negativos; Linha 13: controle positivo; Linha 14: controle negativo; PM: peso molecular de 123 pb.

**Figura 2** – Eletroforese em gel de agarose a 1,5 % mostrando resultado da RT-PCR

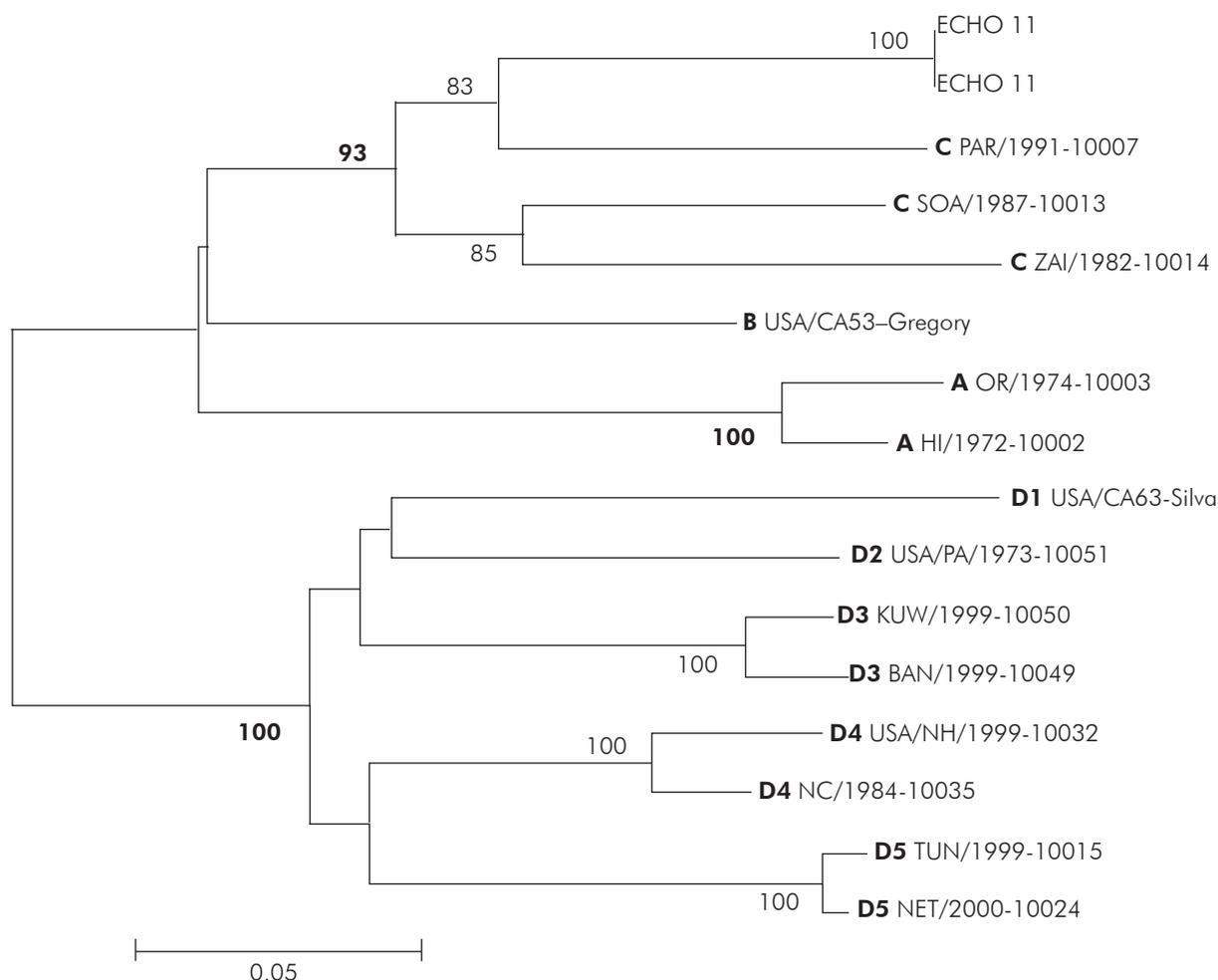


**Figura 3** – Representação gráfica das amostras de sorotipos por Estado

**Tabela 2** – Distribuição dos gêneros e sorotipos identificados nas amostras fecais suspeitas de infecção por EV, testadas pelo Laboratório de Enterovírus do IEC, no período de janeiro de 1996 a dezembro de 2006

Gênero	Sorotipo	N
<i>Echovirus</i>	Echo 1	4
	Echo 3	1
	Echo 11	4
	Echo 13	2
	Echo 14	2
	Echo 17	2
	Echo 19	2
	Echo 25	2
	Echo 33	1
	<i>Coxsackievirus</i>	Cox A17
Cox B5		2
Cox B6		5
<i>Enterovirus</i>	Enterovirus B	2
	Enterovirus 96	2
	Enterovirus 99	2
	Poliovirus tipo 2*	2
	Poliovirus tipo 3*	2
Total		40

\* Sorotipos vacinais.



**Figura 4** – Dendrograma mostrando a classificação genética de amostras do sorotipo Echovirus 11 obtidas de amostras fecais suspeitas de PFA e encaminhadas ao IEC no período de 1996 a 2006, Região Norte do Brasil

## DISCUSSÃO

Neste estudo foi observado 14,5% de positividade para EV, inferior à frequência encontrada de 15,2% por Gomes et al<sup>4</sup>. Os dados obtidos por Gomes et al<sup>4</sup> também indicaram maior sensibilidade da RT-PCR como método de identificação viral, atualmente bastante utilizada no diagnóstico das enterovirose<sup>12</sup>. O percentual de identificação utilizando a técnica de sequenciamento foi de 78,4% (40/51), o sorotipo Echo 11 foi um dos mais prevalentes. Resultados similares foram demonstrados em um estudo na Finlândia<sup>13</sup> em que o Echo 11 foi um dos mais frequentes EV identificados. Em 1977, houve um surto familiar ocorrido na Cidade de Belém, Estado do Pará, pelo Echo-12, acometendo crianças de 1 a 10 anos de idade, com quadro de febre, exantema, eritemato-maculopapular e linfadenopatia cervical. Vale ressaltar que outros enterovírus como EV-D70, EV-A16 e uma variante antigênica do Cox-A24 já causaram surtos ou mesmo epidemias na Região Amazônica<sup>14</sup>. No presente estudo, o sequenciamento parcial da região VP1 (~356 pb) permitiu a classificação das amostras de Echo 11 no genogrupo C. Em análises comparativas, amostras da América Latina e África do Sul também agruparam-se neste genogrupo, enquanto as dos Estados Unidos foram classificadas dentro do genogrupo D<sup>15</sup>.

Os Cox e os Echo têm distribuição universal. A literatura demonstra a ocorrência desses agentes causando doença em diversos países.

## CONCLUSÃO

Diante da erradicação dos poliovírus selvagens, torna-se importante saber a etiologia viral nos casos de PFA, considerando-se que o grande percentual de

atingidos são crianças, o que requer cuidados maiores. O sequenciamento genômico é uma ferramenta importante na identificação dos EVNP, pois fornece resultados em um período de tempo menor, o que é benéfico para o paciente; permite uma melhor compreensão sobre a circulação desses agentes em território brasileiro, bem como sobre aspectos moleculares inerentes a esses vírus. O panorama nacional referente a esse assunto é de grande relevância, o que justifica as pesquisas para EV e o que pode levar à detecção de novos sorotipos. O IEC tem um acervo considerável de amostras fecais isoladas de casos de PFA e outras enterovirose e esses importantes achados são de grande relevância para saúde pública. Conclui-se que este estudo resalta a circulação de EVNP com alto grau de diversidade genética.

## AGRADECIMENTOS

A dra. Maria de Lourdes Contente Gomes, pelo apoio e acima de tudo por ter confiado em minha capacidade. Aos profissionais do Laboratório de Enterovírus, à msc. Ana Lucia Monteiro Wanzeller, Euda Galiza Primo, Edna da Silveira, e em especial Antonia dos Santos Alves, e à msc. Darleise de Souza Oliveira pelos ensinamentos. Ao dr. Alexandre da Costa Linhares, pela dedicação junto ao nosso Laboratório e pelo seu exemplo de profissionalismo.

## APOIO FINANCEIRO

Instituto Evandro Chagas/SVS/MS e ao Programa Institucional de Iniciação Científica (PIBIC-IEC) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa (FAPESPA).



## Isolation and molecular identification of enteroviruses in cases of non-polio acute flaccid paralysis, occurred in Northern Brazil from 1996 to 2006

### ABSTRACT

Enteroviruses (EV) of human origin belong to the family *Picornaviridae*, they have 30 nm in diameter, genome of single-stranded RNA, with fecal-oral transmission and have been related to outbreaks of several diseases of the central nervous system. This study aimed to identify the presence of non-polio enteroviruses (NPEV) isolated from cases of acute flaccid paralysis (AFP). Cell lines Hep-2C and RD that presented cytopathic effect were selected for further molecular tests. The viral RNA was extracted using QIAamp Viral RNA mini kit. Primers 222 and 292, which increased part of the VP1 region of EV genome, were used in the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for molecular virus detection, producing an amplicon of 356 nucleotides. From 1996 to 2006, 538 fecal samples of AFP suspected cases from Northern Brazil were sent to the Instituto Evandro Chagas. Of this total, 78 (14.5%, 78/538) presented cytopathic effect in both cell lines. Thereafter, 51 (65.4%, 51/78) were positive by RT-PCR. EV positive cases were detected in the States of Amazonas (14/51, 27.4%), Amapá (13/51, 25.5%), Pará (11/51, 21.6%), Rondônia (10/51, 19.6%) and Tocantins (3/51, 5.9%). Genomic sequencing identification was performed in 40 samples. Echovirus (20 cases, nine serotypes) and coxsackievirus (ten cases, three serotypes) were the predominant species found. The results of this study corroborate others conducted in Brazil and in the world, and serve as basis for better understanding about molecular epidemiology of EV circulating in the Amazon Region and its connection with several serotypes cases of neurologic diseases.

**Keywords:** Non-polio Enteroviruses; Molecular Identification; Coxsackievirus Infections; Echovirus; Amazon.

## Aislamiento e identificación molecular de los enterovirus no polio en casos de parálisis flácida aguda, ocurridos en la Región Norte de Brasil, en el período de 1996 a 2006

### RESUMEN

Los enterovirus (EV) de origen humano pertenecen a la familia *Picornaviridae*, tienen 30 nm de diámetro, genoma de ARN de hebra simple, su transmisión es vía fecal-oral y han sido relacionados a brotes de diversas enfermedades del sistema nervioso central. El estudio tuvo como objetivo identificar la presencia de enterovirus no polio (EVNP) aislados de casos de parálisis flácida aguda (PFA). Linajes celulares HEp-2C y RD que presentaron efecto citopático fueron seleccionadas para pruebas moleculares posteriores. El ARN viral se extrajo utilizando el *kit* QIAamp Viral ARN. Los iniciadores 222 y 292, que amplifican parte de la región VP1 del genoma de los EV, fueron usados en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa precedida de transcriptasa reversa (RT-PCR) para la detección molecular viral, produciendo un amplicón de 356 nucleótidos. Entre los años de 1996 a 2006, 538 muestras fecales de casos sospechosos de PFA, provenientes de toda la Región Norte de Brasil, fueron enviadas al Instituto Evandro Chagas. De este total, 78 (14,5%; 78/538) presentaron efecto citopático en los dos linajes celulares. Posteriormente, 51 (65,4%; 51/78) fueron positivas por RT-PCR. Los casos positivos de EV se detectaron en los Estados de Amazonas (14/51; 27,4%), Amapá (13/51; 25,5%), Pará (11/51; 21,6%), Rondônia (10/51; 19,6%) y Tocantins (3/51; 5,9%). La identificación por secuenciación genómica fue posible en 40 muestras. Echovirus (20 casos, nueve serotipos) y coxsackievirus (diez casos, tres serotipos) fueron las especies predominantes halladas. Los resultados de este estudio corroboran otros realizados en Brasil y en el mundo, y sirven de base para la mejor comprensión de la epidemiología molecular de los EV circulantes en la Región Amazónica y la asociación de sus diversos serotipos con casos de enfermedades neurológicas.

**Palabras clave:** Enterovirus No Pólio; Identificación Molecular; Infecciones por Coxsackievirus; Echovirus; Amazonia.



### REFERÊNCIAS

- 1 The Pirbright Institute. Enterovirus [Internet]. 2006 [cited 2014 Jan 9]. Available from: <http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>.
- 2 Wiedbrauk DL, Johnston SLG, editors. Manual of clinical virology. New York: Raven Press; 1993. Enteroviruses; p. 92-7. v. 1.
- 3 Gomes MLC, Nakauth CM, Freitas RB, Macêdo O. Poliomielite e outras enterovirose. In: Ministério da Saúde (BR). Fundação Serviços de Saúde Pública. Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Belém: Instituto Evandro Chagas; 1986. p. 591-600.
- 4 Gomes MLC, Nakauchi CK, Sousa LN, Souza EGP, Silva ZFG, Pantaleão FST, et al. Enterovirus não pólio isolados de casos de paralisias flácidas agudas examinadas no Instituto Evandro Chagas no período de 1998 a 2000. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(supl 1):376.
- 5 Dietz V, Andrus J, Olivé JM, Cochi S, Quadros C. Epidemiology and clinical characteristics of acute flaccid paralysis associated with non-polio enterovirus isolation: the experience in the Americas. *Bull World Health Organ*. 1995;73(5):597-603.
- 6 Junttila N, Lévêque N, Kabue JP, Cartet G, Mushiya F, Muyembe-Tamfum JJ, et al. New enteroviruses, EV 93 and EV 94, associated with acute flaccid paralysis in the Democratic Republic of the Congo. *J Med Virol*. 2007 Apr;79(4):393-400.
- 7 World Health Organization. Polio laboratory manual. Geneva: World Health Organization; 2004.
- 8 Oberste MS, Nix AW, Kaija M, Pallansch MA. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol*. 2003 Apr;26(3):375-7.
- 9 Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA 3: integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*. 2004 Jun;5(2):150-60.
- 10 Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980 Dec;16(2):111-20.
- 11 Felsenstein J. Phylogenetic inference package: version 3.69. Department of Genetics, University of Washington; 2009.
- 12 Lamarão LM, Gomes MLC, Ferreira LLA, Fonseca CM, Araújo LCB, Santana MB, et al. Pesquisa de enterovirus em casos de síndrome de meningite asséptica de Belém, PA. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005 set-out;38(5):391-5.
- 13 Savolainen-Kopra C, Al-Hello H, Paananen A, Blomqvist S, Klemola P, Sobotova Z, et al. Molecular epidemiology and dual serotype specificity detection of echovirus 11 strains in Finland. *Virus Res*. 2009 Jan;139(1):32-8.
- 14 Santos EO. Surto de conjuntivite hemorrágica aguda (CHA) em Belém do Pará, 1984. Utilização dos métodos de neutralização em cultura de tecidos e imunofluorescência indireta. In: Anais do 21º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 1985 fev 3-8; São Paulo. p. 172.
- 15 Oberste MS, Nix WA, Kilpatrick DR, Flemister MR, Pallansch MA. Molecular epidemiology and type-specific detection of echovirus 11 isolates from the Americas, Europe, Africa, Australia, southern Asia and the Middle East. *Virus Res*. 2003 Feb;91(2):241-8.

Recebido em / Received / Recibido en: 31/7/2013  
Aceito em / Accepted / Aceito en: 10/2/2014