CRISTINA ADELAIDE FIGUEIREDO

Epidemiologia molecular do vírus da rubéola isolados no
Estado de São Paulo durante o período de 1997 a 2004

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia do Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título em
Doutor em Ciências.

São Paulo
2010

CRISTINA ADELAIDE FIGUEIREDO

Epidemiologia molecular do vírus da rubéola isolados no
Estado de São Paulo durante o período de 1997 a 2004

Tese apresentada Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração:

Microbiologia

Orientador:

Prof. Dr. Edison Luis Durigon

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Figueiredo, Cristina Adelaide.

Epidemiologia molecular do vírus da rubéola isolados no Estado de São Paulo durante o período de 1997 a 2004 / Cristina Adelaide Figueiredo. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Edison Luiz Durigon.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Virologia molecular e clínica

Versão do título para o inglês: Molecular epidemiology of rubella virus isolated in State of Sao Paulo during 1997-2004.

Descritores: 1. Rubéola 2. Vírus 3. Isolamento viral 4. Reação em cadeia da Polimerase 5. Epidemiologia 6. Genótipos I. Durigon, Edison Luiz II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0118/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cristina Adelaide Figueiredo.

Título da Tese: Epidemiologia molecular do vírus da rubéola isolados no Estado de São Paulo durante o período de 1997 a 2004.

Orientador(a): Edison Luiz Durigon.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

A meus pais, Eduardo e Zulmira (in memoriam), cuja lembrança está sempre ao meu lado, por me mostrar o caminho a ser seguido, pelo amor que só os pais podem dar, pela maneira única de entender a vida, acreditar em Deus e valorizar o próximo. Saudade infinita!

Aos meus irmãos, pelo amor, compreensão e incentivo durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Sou muito grata a todos aqueles que, direta ou indiretamente tornaram possível a realização desta tese,

Agradeço em especial,

Ao Prof. Dr. Edison Luiz Durigon, exemplo de profissional, meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos valiosos, pela orientação da tese, e pelo incentivo à pesquisa e ao crescimento profissional, o meu imenso reconhecimento e admiração.

A Dra. Suely Pires Curti, Diretora do Núcleo de Doenças Respiratórias, pelo constante apoio, incentivo e amizade.

A Maria Isabel de Oliveira, amiga e companheira de tantos anos, pelo incentivo à realização dessa tese, pelas sugestões que muito contribuíram para a realização deste trabalho. Enfim, a tudo que passamos.

A Ana Maria Sardinha Afonso, amiga, companheira de tantos anos, pelo incentivo, pela colaboração, e apoio em todas as horas.

A Cleuza Rodrigues pela valiosa colaboração e sincera amizade.

A Maria Luiza Barbosa, amiga de tantos anos, pelo apoio, orientações, e correções valiosas.

A todos os funcionários do Núcleo de Doenças Respiratórias, em especial, Márcia Theobaldo, Silvana Beres Castrignano, Tuneo Ishimaru, Lucilia Martins, Esmeralda da Cruz, Marcos Nascimento, Rita Paschoalin pelo apoio, compreensão e colaboração.

A Dra. Maria do Carmo Timentsky, diretora do Núcleo de Virologia, pela confiança, pelo respeito e apoio.

A Dra. Luiza T. Madia de Souza, pela confiança, respeito e amizade durante todos estes anos de convívio.

A Dra. Julia M.S.Felipe, pelo apoio constante e incentivo.

A Cecília Luiza Simões pelo constante incentivo e ensinamentos valiosos.

A todos os colegas do Núcleo de Virologia e Seção de Microscopia Eletrônica, pelo apoio, incentivo e amizade.

A todos os funcionários da Secretaria da Pós-Graduação do ICB-USP, principalmente a Alice Shimabuku pelas intruções, colaboração e apoio.
Aos colegas do ICBII pelo incentivo, apoio e amizade.

Ao Jansen Araujo, pela contribuição,colaboração e apoio para a realização deste trabalho.

A Danielle Bruna pela contribuição, colaboração e sugestões.

*Escute o cumprimento do amanhecer,
Olhe este dia porque é a verdadeira vida.
Em seu breve curso está a realidade da nossa
existência,
a benção de crescer, o esplendor da beleza.
Porque o passado é só um sonho e o amanhã,
uma visão
Mas se você aproveitar bem o dia de hoje,
o passado será um sonho de felicidade, e o
amanhã,
uma visão de esperança.*

Canto sânscrito

RESUMO

FIGUEIREDO, C. A. **Epidemiologia molecular do vírus da rubéola isolados no Estado de São Paulo durante o período de 1997 a 2004.** 104 f. Tese (Doutorado em Microbiologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A rubéola é uma doença infecciosa aguda, normalmente com um curso clínico suave. Porém quando adquirida nas primeiras 12 semanas de gestação, pode causar severos defeitos de nascimento, conhecida como Síndrome da Rubéola Congênita (SRC). A caracterização genética do vírus da rubéola é feita analisando a sequência da região hipervariável do gene da glicoproteína E1. Este estudo, apresenta a primeira caracterização molecular de do vírus da rubéola isolados no estado de São Paulo, Brasil. As amostras (sangue, urina, swab de orofaringe, explante de fígado, produto de aborto e fluido cefalorraquidiano) foram coletados entre 1997 e 2004 de pacientes com sintomas clínicos de rubéola. O gene E1 vírus da rubéola foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase em cadeia diretamente de espécimes clínicos e isolados, e os fragmentos de DNA obtidos foram seqüenciados. As seqüências foram alinhadas para a análise filogenética, com seqüências representativas dos diferentes genótipos do vírus da rubéola. Vinte e nove isolados foram obtidos, incluindo isolados relacionados com insuficiência hepática aguda, encefalite e infecções congênitas. A análise filogenética mostrou que 19 dos 29 vírus da rubéola isolados pertencem ao genótipo 1a, e 10 pertencem ao genótipo 1G. Este trabalho demonstrou dois genótipos do vírus da rubéola circularam simultaneamente entre os anos de 1997-2004.

Palavras-chave: Rubéola. Vírus. Isolamento viral. Reação em cadeia da polimerase. Epidemiologia. Genótipos.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, C. A. **Molecular epidemiology of rubella virus isolated in State of Sao Paulo during 1997-2004.** 104 p. PhD Thesis (Microbiology)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Rubella is an acute infectious disease with normally a mild clinical course. However, infections during pregnancy, especially before week 12 of gestation (WG), can cause severe birth defects known as congenital rubella syndrome (CRS). Genetic characterization of wild-type rubella virus is based on sequence analysis of a hypervariable region of the glycoprotein E1 gene. This study presents the first molecular characterization of isolates from São Paulo, Brazil. Samples (blood, urine, oropharyngeal swab, explanted liver, product of conception and cerebrospinal fluid) were collected between 1997 and 2004 from patients with clinical symptoms of rubella. The rubella virus E1 gene coding region was amplified by reverse transcriptase polymerase chain reaction directly from clinical specimens and isolates, and the resulting DNA fragments were sequenced. Sequences were assigned to genotypes by phylogenetic analysis with rubella virus reference sequences. Twenty-nine isolates were obtained, including isolates from acute liver failure, encephalitis and congenital infections. Phylogenetic analysis showed that 19 out of 29 isolated in the São Paulo strains of rubella virus belonged to genotype 1a, and 10 strains to genotype 1G. This work demonstrated two genotypes of RV circulated simultaneously between years 1997 and 2004 in the state of São Paulo. The information reported in this paper may be useful for contributes to understand better the molecular epidemiology of RV in São Paulo, Brazil.

Key-words: Rubella. Virus. Isolation. Polymerase chain reaction. Epidemiology. Genotypes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fotomicrografia eletrônica do vírus da rubéola isolado em cultura de células	22
Figura 2.	Desenho da representação da partícula viral do vírus da rubéola com seus principais componentes.	24
Figura 3.	Fotomicrografia eletrônica de células Vero infectadas com o vírus da rubéola.	25
Figura 4.	Esquema da representação da organização genômica do vírus da rubéola	28
Figura 5.	Resolução do Comitê Executivo da OPAS	34
Figura 6.	Distribuição dos genótipos do vírus da rubéola no mundo, no período de 1995-2008	38
Figura 7.	Fluxograma do diagnóstico laboratorial para os pacientes com suspeita de infecção pelo vírus da rubéola	51
Figura 8.	Esquema de amplificação do genoma da glicoproteína E1 do vírus da rubéola a partir do fragmento gerado pelos primers R2 e R7 no PCR e R11 e R8c no nested.	62
Figura 9.	Esquema da amplificação do genoma da glicoproteína E1 do vírus da rubéola a partir do fragmento gerado pelos primers R66, R65 e R85 no PCR e R85 e R72 no nested-PCR.	66
Figura10.	Análise por eletroforese em gel de agarose do produto de PCR gerado com os primers R7, R2 (A) e no nested-PCR gerado com os primers R11 e R8c (B).	74
Figura 11.	Fotomicrografias das células Vero e SIRC não inoculadas (A e C) e inoculadas com o vírus da rubéola (B e D).	77
Figura 12.	Fotomicrografia eletrônica do vírus da rubéola, isolado em cultura de células SIRC inoculadas com amostra do caso nº27	78

- Figura 13. Fotomicrografias obtidas do explante do 79 fígado corado com hematoxilina-eosina (A,B,C,D,E,F). Fotomicrografias da detecção imunohistoquímica do antígeno do vírus da rubéola em parafina fixadas em formalina (G,H, I).
- Figura 14. Arvore filogenética da seqüências da 81 glicoproteína E1 do vírus da rubéola analisadas neste estudo .
- Figura 15. Análise de identidade e divergência, pelo método ClustalX, das amostras seqüenciadas na região E1 do vírus da rubéola que pertencem ao genótipo 1a
- Figura 16. Análise de identidade e divergência, pelo método ClustalX, das amostras seqüenciadas na região E1 do vírus da rubéola que pertencem ao genótipo 1G

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Manifestações clínicas da Síndrome da Rubéola Congênita: comuns, transitórias e pouco frequentes
Tabela 2-	Relação dos casos que foram analisados e selecionados para sequenciamento gênico.
Tabela 3-	Sequências dos primers utilizados na PCR para diagnóstico da infecção pelo vírus da rubéola
Tabela 4-	Sequências dos primers utilizados na PCR para sequenciamento da glicoproteína E1 do vírus da rubéola
Tabela 5-	Representação das linhagens de referência dos genótipos do vírus da rubéola, baseado no ano do isolamento, país e número de acesso no "GenBank
Tabela 6-	Resultado das sorologias, RT-PCR nas amostras, Isolamento viral e RT-PCR das células inoculadas
Tabela 7-	Resultados de Máxima e Mínima Similaridade pelo método ClustalX, das amostras seqüenciadas na região E1 do vírus da rubéola.
Tabela 8-	Resultado dos genótipos obtidos das seqüências amplificadas da região E1 do vírus da rubéola

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Gráfico da distribuição do numero de casos confirmados de rubéola no Brazil, 1993-2004	30
Gráfico 2.	Gráfico da distribuição do numero de casos de rubéola no Estado de São Paulo, 1992-2004	31
Gráfico 3.	Gráfico da distribuição do número de casos por fixa etária no Estado de São Paulo em 2000.	32
Gráfico 4.	Gráfico da distribuição do número de casos de gestantes e SRC confirmados no Estado de São Paulo de 1992 a 2004	33
Gráfico 5.	Gráfico da distribuição dos casos notificados de rubéola nas Américas, 1980-2004	35
Gráfico 6.	Gráfico da distribuição do número de casos de rubéola no Estado de São Paulo, 2000 a 2008	36
Gráfico 7.	Distribuição dos genótipos encontrados em São Paulo no período de 1997 a 2004	85

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementar
CDC	Centers for Diseases Control and Prevention
DNA	Acido dextribonucleico
dNTP	Desoxinucleotideos trifosfato (do inglês, <i>Deoxynucleoside Triphosphates</i>)
DTT	Ditiotreitol
ECP	Efeito citopático
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ICR	Infecção Congênita por Rubéola
IF	Imunofluorescência
IgM	Imunoglobulina da classe M
IgG	Imunoglobulina da classe G
Kda	Kilodalton (10 ³ daltons)
L	Litro
M	Molar
mL	Mililitro (10 ⁻³ litro)
mM	Milimolar (10 ⁻³ molar)
mRNA	RNA mensageiro
nM	Nanomol
nt	Nucleotideos
p	Poliproteína
pH	Potencial hidrogeniônico
PCR	Reação em cadeia pela polimerase (do inglês: polymerase chain reaction)
PM	Peso MOlecular
RN	Recém-nascido
RNA	Acido ribonucléico (do inglês: ribonucleic acid)
RNAse	Ribonuclease
RT	Transcriptase reversa
PCR	Reação em cadeia pela polimerase após transcrição reversa
SRC	Síndrome da Rubéola Congênita
TA	Temperatura Ambiente
TBE	Tampão tris-borato EDTA
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
VR	Vírus da Rubéola
°C	Graus Celcius
µg	Micrograma (10 ⁻⁶ grama)
µL	Microlitro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	Histórico	20
2.2	Classificação	22
2.2.1	Características do Virus da Rubéola	22
2.2.2	Organização Genômica	25
2.2.3	Multiplicação do Genoma	26
2.3	Epidemiologia da Rubéola	29
2.4	Genótipos da Rubéola	37
2.5	Transmissão	39
2.6	Aspectos Clínicos	39
2.6.1	Infecção Adquirida Pós Nascimento	39
2.6.2	Infecção Congênita	40
2.6.3	Resposta Imune Fetal	42
2.7	Vacinas	42
2.8	Reinfecção	45
2.9	Diagnóstico Laboratorial	46
2.10	Diagnóstico da Síndrome da Rubéola Congênita (SRC)	48
3	OBJETIVOS	49
3.1	Objetivo Geral	49
3.2	Objetivos Específicos	49
4	MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1	Casuística	50
4.2	Pacientes	52
4.3	Coleta das Amostras	54
4.4	Processamento das Amostras	55
4.4.1	Soro	55
4.4.2	Células Mononucleares	55
4.4.3	Urina e Swab de Orofaringe	55
4.4.4	Líquido Cefalorraquidiano	56
4.4.5	Explante de Fígado	56
4.4.6	Produto de Aborto	57
4.5	Sorologia	57
4.6	Isolamento Viral	58
4.7	Microscopia Óptica	58
4.7.1	Coloração com Azul de Toluidina	58
4.7.2	Coloração com Hematoxilina-eosina	59
4.7.3	Imunohistoquímica	59
4.7.4	Microscopia Eletrônica	61
4.8	Extração do RNA total	61
4.9	Diagnóstico por RT-PCR	61
4.9.1	Reação de Transcrição Reversa (RT)	63
4.9.2	Reação da Polimerase em cadeia (PCR)	63
4.9.3	Reação de nested-PCR	63
4.9.4	Deteção do Produto Amplificado	64
4.10	Sequenciamento da Glicoproteína E1	64
4.10.1	Reação de Transcrição Reversa (RT)	64
4.10.2	Descrição dos Oligonucleotídeos (Primers)	64
4.10.3	Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	67
4.10.4	Reação de nested-PCR	68

4.10.5	Purificação do DNA para Reação de Sequenciamento-----	68
4.10.6	Reação de Sequenciamento (Cycle Sequencing)-----	68
4.10.7	Purificação do DNA após Reação do Sequenciamento-----	69
4.10.8	Edição e Alinhamento das Sequências do Gene E1 do Vírus da Rubéola-----	69
4.10.9	Análise Filogenética-----	70
5	RESULTADOS -----	72
5.1	Quadro Clínico-----	72
5.2	Sorologia-----	73
5.3	Comparação das Técnicas de Isolamento Viral e RT-PCR para o Diagnóstico do Vírus da Rubéola-----	73
5.4	Isolamento Viral em Cultura de Células	76
5.5	Coloração de Hematoxilina-eosina e Imunohistoquímica	78
5.6	Amplificação e Filogenia da região E1 do Genoma do Vírus da Rubéola-----	80
6	DISCUSSÃO -----	87
7	CONCLUSÕES -----	93
	REFERÊNCIAS -----	94

1 INTRODUÇÃO

Descoberta no final do século XVIII, a rubéola tem sido eliminada em vários países desenvolvidos nos últimos 30 anos, graças as campanhas de vacinação. Embora seja uma doença benigna em crianças e adultos, assume proporções às vezes devastadoras, quando acomete gestantes não imunes, principalmente no primeiro trimestre da gestação. A Síndrome da Rubéola Congênita (SRC) pode ser considerada uma doença viral crônica que inicia-se na vida intra-uterina e continua na infância. O potencial lesivo do vírus da rubéola foi confirmado no início da década de 1960, quando iniciou-se técnicas para seu cultivo e os critérios sorológicos para o diagnóstico da infecção em gestantes foram definidos (WEBSTER, 1998). A rubéola e a SRC tem sido controlada pelos diversos programas de imunização que ocorrem ao redor do mundo, entretanto, surtos entre indivíduos não vacinados ainda ocorrem. Infelizmente, casos de SRC ainda continuam ocorrendo em vários países apesar da cobertura vacinal. No Brasil a vacinação rotineira contra a rubéola, nos programas públicos, iniciou-se em 1992, no Estado de São Paulo e, gradativamente, foi implantada nos outros estados. No ano de 2000 as 27 unidades da federação, já aplicavam a vacina tríplice viral (contra o sarampo, caxumba e rubéola), no calendário básico, aos 15 meses de idade. No Brasil, nos anos de 1999, 2000, 2001 e 2007 ocorreram epidemias de rubéola em vários estados que contribuíram significativamente para elevar a incidência da rubéola, tendo como principal alvo homens e mulheres jovens. Portanto, a rubéola ainda é um problema de saúde pública, com impacto no orçamento de vários países. Em 2003, os representantes de diversos países das Américas e da Organização Panamericana de Saúde (OPAS) marcaram até o ano de 2010 para a erradicação da rubéola e da Síndrome da Rubéola Congênita nas Américas.

Atualmente, a epidemiologia molecular tem sido utilizada no auxílio do controle e monitoramento das doenças virais, pois a variabilidade da sequência nucleotídica de um agente etiológico permite sua classificação dentro de classes ou genótipos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005, 2007). Na literatura nacional, ainda não há relato sobre a filogenia do vírus rubéola no Estado de São Paulo. A detecção do vírus da rubéola em amostras clínicas de pacientes com

suspeita da doença faz parte do Programa de Controle da Rubéola e da Síndrome da Rubéola Congênita (SRC) realizado pelo Instituto Adolfo Lutz. A caracterização deste vírus isolados das amostras clínicas enviadas ao Instituto Adolfo Lutz possibilitará o estudo gênico desse vírus, além de proporcionar, melhor compreensão nos mecanismos de infectividade dos vírus da rubéola circulantes no Estado de São Paulo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

A rubéola já era conhecida na antiguidade pelos médicos árabes como uma variedade do sarampo. A primeira descrição da rubéola data do século XVIII, quando dois médicos alemães, Bergen em 1752 e Orlow em 1758 descreveram a doença, denominada inicialmente como sarampo alemão. Manton em 1814 foi o primeiro a reconhecer que a rubéola era uma doença benigna, distinta do sarampo e da escarlatina sendo então na época denominada Röttein (COOPER, 1985). Em 1866, foi denominada Rubéola (do latim *coisas vermelhas*) por Henry Veale (LEE; BOWDEN, 2000) mas, somente em 1881 durante o Congresso Internacional Médico em Londres, a Rubéola passou a ser uma doença distinta do sarampo e da escarlatina (ASSAD ; LJUNGARS-ESTEVES, 1985).

Feer (1922) afirmou que a rubéola poderia ser transmitida da gestante ao feto, porém devido ao seu caráter benigno pouca atenção foi dada. O agente etiológico da doença foi descrito por Hiro e Tasaka em 1938 (FORBES, 1969; SANTIS et al., 2005).

A rubéola só ganhou notoriedade em 1941, quando Norman MacAlister Gregg, um oftalmologista australiano, constatou a sua teratogenicidade. Nesse período, ocorreu na Austrália uma epidemia de rubéola e inúmeras crianças nasceram com catarata congênita. Gregg estudou detalhadamente 78 recém-nascidos (RN) portadores de defeitos congênitos, a maioria das mães, destes RN, havia tido contato com pessoas com rubéola durante o primeiro ou segundo mês da gravidez. Além da catarata outras alterações congênitas foram descritas: lesões cardíacas e baixo peso. A descoberta de Gregg, causou profundo impacto, pois, pela primeira vez, a origem das malformações não era atribuída somente a alterações genéticas, mas à ação de um agente infeccioso sobre o feto (HORSTMANN et al., 1976).

Inicialmente a descoberta foi recebida pela comunidade científica com muitas ressalvas, mas, posteriormente outros relatos de epidemiologistas e geneticistas, confirmaram a associação entre o vírus da rubéola e a ocorrência de catarata congênita, além de outros defeitos como deficiência auditiva (HORSTMANN, 1976; LEE; BOWDEN, 2000).

Green et al. (1965), realizaram estudos em pacientes voluntários e mostram que a viremia ocorria no estágio pré eruptivo, provando que a infecção poderia ocorrer sem lesão exantemática (HORSTMANN, 1969; 1976).

O vírus foi isolado cerca de 20 anos após a descoberta de Gregg, em 1962 por dois grupos de pesquisadores Weller e Neva em Boston e por Parkman, Beuscher e Artenstein em Washington, DC (PARKMAN 1962; WELLER, 1962). Parkman et al. (1962) inocularam células de rim de macaco verde africano (VERO) com amostra de lavado de garganta de pacientes com rubéola e demonstraram a presença do vírus da rubéola pela resistência ao desafio com echovírus. Por sua vez, Weller e Neva (1962) detectaram o crescimento do vírus da rubéola em células de amnion humano utilizando amostras de sangue e urina. Os resultados destes pesquisadores foram o alicerce para o desenvolvimento das vacinas (LEE; BOWDEN, 2000).

Após as pandemias que ocorreram na Europa entre 1962 e 1963, e, nos Estados Unidos da América (EUA), entre 1964 e 1965, com o custo de cerca de 2 bilhões de dólares (WITTE et al., 1969), diversos conceitos foram descritos sobre o risco de transmissão fetal, confirmando a gravidade desta infecção durante o primeiro trimestre de gestação (SIEGEL et al., 1968; SEVER et al., 1965; COOPER; PRELUB; ALFORD, 1995; WEBSTER, 1998).

A ocorrência de milhões de casos de rubéola e o nascimento de crianças com malformações estimulou estudos para o desenvolvimento e produção de uma vacina eficaz contra o vírus da rubéola e, entre 1965 e 1967 cepas vacinais já estavam sendo testadas (MEYER et al., 1969; PLOTKIN et al.; 1969; 2006).

Programas de imunização tem sido realizados em várias partes do mundo, mas surtos entre indivíduos não vacinados ainda ocorrem (ROBERTSON, 2003). A Organização Panamericana de Saúde (OPAS), em 1997, tomou medidas para implementar a campanha de vacinação para rubéola. Em setembro de 2003, adotou uma resolução que visa eliminar a rubéola e a síndrome da rubéola congênita até 2010 (BEST et al., 2005).

2.2 Classificação

O vírus da rubéola (VR) é um membro do gênero *Rubivirus*, da família *Togaviridae*. O nome *togavírus* é derivado do latim *toga*, que significa manto romano, uma referência dada ao envelope do vírus. A família *Togaviridae* possui um outro gênero, o *Alphavirus*, que compreende pelo menos 27 espécies. Enquanto os seres humanos são considerados os únicos hospedeiros naturais e reservatórios do VR, os vírus do gênero *Alphavirus* são transmitidos por artrópodes. O vírus da rubéola e os *alphavirus* têm características similares quanto à estratégia de multiplicação e organização genômica (MURPHY et al., 1995; LEE; BOWDEN, 2000; CHANTLER 2001; SCHLESINGER ; SCHLESINGER, 2001).

2.2.1 Características do Vírus da Rubéola

O vírus da rubéola apresenta-se como uma partícula esférica com diâmetro de 60-70 nm quando visualizado por técnicas de microscopia eletrônica (Figura 1).

Figura 1. Fotomicrografia eletrônica do vírus da rubéola isolado em cultura de células. Coloração negativa. Aumento 75.000X. Fotografia cedida pela Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz.

O vírion consiste de um *core* elétron-denso de 30-35 nm, envolvido por um envelope lipídico derivado da célula hospedeira. O *core* é formado de uma fita única de RNA 40S e múltiplas cópias da proteína C (cápside), que interagem com o RNA genômico. As outras duas proteínas estruturais codificadas pelo vírus, são as glicoproteínas E1 e E2, ligadas entre si formando heterodímeros inseridas no envelope, os quais se projetam na superfície do vírus como espículas de 5-6nm de comprimento (Figura 2). (LEE; BOWDEN 2000, CHANTLER; WOLINSKY; TINGLE, 2001). Essas proteínas tem a capacidade de aglutinar hemácias de ave *in vitro* (FREY, 1994). A proteína E1 é a maior e principal proteína de superfície viral. Tem peso molecular entre 58.000 e 62.000 Dalton. A proteína E1 é derivada de um precursor polipeptídico intracelular e está diretamente envolvida na ligação do vírus na superfície celular das células que compõem o sistema linfático para que ocorra o início da infecção (LEE ; BOWDEN, 2000; CHANTLER; WOLINSKY; TINGLE 2001). Além disso, é a molécula dominante da superfície celular, e por isso, é o principal alvo do sistema imunológico (HOBMANN; CHANTLER 2007).

A proteína E2 pertence a uma família de moléculas com peso molecular entre 42.000 a 54.000 Dalton classificadas em E2a e E2b, conforme o seu grau de glicosilação (WAXHAM; WOLINSKY,1983; LEE; BOWDEN, 2000; CHANTLER; WOLINKY; TINGLE, 2001) . A sua função esta associada com a infectividade viral e com a hemaglutinação do vírus (GREEN et al., 1986; HOBMANN; CHANTLER 2007).

Figura 2. Representação da partícula viral do vírus da rubéola com seus principais componentes.

Fonte: Prefeitura da cidade de São Paulo
Secretaria da Saúde

2.2.2 Organização Genômica

O vírus da rubéola é uma molécula RNA de fita simples, polaridade positiva, de aproximadamente 9.700 nucleotídeos. A extremidade 5' tem um *cap* de 7-metilguanosina, e na continuação do final 3' uma cauda poliadenilada de 53 nucleotídeos em média. O genoma contém duas grandes estruturas em fase de leitura (*open reading frames*, ORFs), separadas por uma região não codificadora de 123 nucleotídeos. A ORF da extremidade 5' codifica as duas proteínas não estruturais p150 e p90, necessárias à transcrição e multiplicação do RNA, enquanto a ORF do final 3' codifica as três proteínas que formam a estrutura viral: as glicoproteína E1, E2 e a proteína C (LEE; BOWDEN, 2000; CHANTLER; WOLINSKY; TINGLE, 2001). Além da região entre as duas ORF, há outras duas regiões que não codificam proteínas, precedendo a primeira ORF e na região 3' do genoma, de 40 e 62 nucleotídeos respectivamente. Nessas três regiões há estruturas secundárias às quais são atribuídas funções de regulação, replicação e tradução do genoma (VAHERI et al., 1972; CHANTLER; WOLINSKY, TINGLE, 2001).

A sequência completa de nucleotídeos do vírus da rubéola para algumas cepas atenuadas e selvagens já foram descritas (DOMINGUEZ, 1990; FREY, 1993; PUGACHEV 1997; CHANTLER, WOLINSKY; TINGLE, 2000; KAKIZAWA et al., 2001; HOFMANN et al., 2003; ZHENG et al., 2003c). O vírus da rubéola tem alta quantidade de guanossina e citosina (G e C), correspondente a 69% do genoma, a mais alta taxa de G+C identificada em um vírus RNA (LEE; BOWDEN, 2000; CHANTLER; WOLINSKY; TINGLE, 2001). A comparação do genoma de três cepas virais mostrou similaridade entre elas, variando de 97,2% a 99% e, em relação às sequências de aminoácidos, a variação foi de 97,6% a 98,9% (PUGACHEV; FREY, 1997).

2.2.3 Multiplicação do genoma

A multiplicação do vírus da rubéola é lenta, compreendendo um período de 12 horas (BOWDEN; WESTAWAY, 1989; FREY 1994; LEE; BOWDEN, 2000). O início da replicação celular ocorre no citoplasma celular após a penetração do vírus na célula por endocitose (Figura 3).

Figura 3. Microscopia Eletrônica de células Vero infectadas com o vírus da rubéola. A- Penetração do vírus por endocitose; B- A partícula viral dentro de um endossomos semelhantes a vacúolos. C- Note vários vírions da rubéola dentro dos vacúolos. X100.
Fonte: Lee e Bowden (2000).

O ácido nucléico, RNA viral, liga-se ao retículo endoplasmático rugoso, servindo como modelo para a tradução da proteína. Após a síntese das glicoproteínas E1 e E2 no retículo endoplasmático, ocorre o amadurecimento viral dentro do Complexo de Golgi, mitocôndria ou retículo endoplasmático rugoso. A capacidade do vírus amadurecer dentro dos vacúolos intracelulares e assim, evitar a resposta do sistema imunológico, pode ser um fator determinante da estabilidade e permanência da infecção em humanos (FREY et al, 1994). O vírus maduro é transportado em vacúolos e expelido por brotamento intracelular.

Após a liberação do seu RNA genômico, este é utilizado como mRNA para a produção das proteínas não estruturais que são utilizadas para a síntese da fita complementar negativa do RNA, do RNA genômico e do RNA subgenômico (LEE; BOWDEN, 2000). A ORF que fica na região 5' do genoma é traduzida para uma poliproteína de 240kd, que posteriormente é clivada em dois polipeptídeos, de 150 e 90kd. A proteína p150 tem a função de protease e metil-transferase, esta última aparentemente implicada no *capping* do RNA. A proteína p90 tem as funções de replicase e helicase. Estas enzimas catalizam tanto a replicação do RNA por meio da síntese do RNA antígenômico, quanto do mRNA subgenômico, que dirige a síntese das proteínas estruturais. A tradução do mRNA subgenômico produz uma outra poliproteína que dá origem às proteínas estruturais (Figura 4). Os genomas replicados podem ou não ser traduzidos para produzir mais proteínas estruturais ou participar da montagem (maturação) das partículas virais juntamente com as proteínas estruturais, formando a progênie viral (BALL, 2001; CHANTLER; WOLINSKY; TINGLE 2001; SCHLESINGER ; SCHLESINGER , 2001).

Figura 4. Esquema da representação da organização genômica do vírus da rubéola.
P: proteína

2.3 Epidemiologia da Rubéola

A rubéola é de ocorrência sazonal, com aumento do número de casos no final do inverno e início da primavera. No período anterior à vacinação ocorriam epidemias a cada 6 a 9 anos, acometendo crianças entre 5 e 14 anos de idade e, mais raramente, crianças menores de um ano de idade.

Nos Estados Unidos, em 1964, 12,5 milhões de pessoas adoeceram por rubéola, sendo a maior epidemia de rubéola já descrita, resultando em cerca de 13.000 mortes fetais e neonatais e 20.000 crianças afetadas pela SRC (SIEGEL et al., 1968). Como consequência desta epidemia, a rubéola e a SRC tornaram-se doença de notificação compulsória nos EUA em 1966. Entre 1969 e 1988, observou-se uma redução de 99% na incidência da rubéola após as estratégias de vacinação adotadas (LINDEGREN et al., 1991). Atualmente, a incidência de rubéola neste país está, desde 2001, em torno de 0,02 casos por 100.000 habitantes. Observam-se surtos esporádicos acometendo adultos, em sua maior parte, originários de países onde a vacinação contra a rubéola não é realizada rotineiramente (REEF et al., 2002, ROBERTSON et al., 2003).

A SRC também acompanhou esta queda na incidência. Em 1964, durante a epidemia, a incidência de SRC era de 16 casos por 100.000 nascidos vivos, apresentando um decréscimo de 2,7 casos por 100.000 nascidos vivos em 1969 (LINDEGREN et al., 1991). Entre 2001-2004, foram notificados quatro casos de SRC, sendo que três eram filhos de mulheres imigrantes. A baixa incidência de rubéola e SRC e a ausência de transmissão endêmica nos EUA por mais de 12 meses levaram o CDC a considerar que houve a interrupção da transmissão da rubéola endêmica em 2004 (ICENOGLE et al, 2006).

No Brasil a vacinação rotineira contra a rubéola, nos programas públicos, iniciou-se em 1992, no Estado de São Paulo e, gradativamente, foi implantada nos outros estados. No ano de 2000 as 27 unidades da federação, já aplicavam a vacina tríplice viral (contra o sarampo, caxumba e rubéola), no calendário básico, aos 15 meses de idade. A rubéola passa a integrar a lista de doenças de notificação compulsória no Brasil, somente, na segunda metade da década de 90. Em 1997, ano em que o país enfrentou a última epidemia de sarampo, foram confirmados 32825 casos de rubéola, sendo que no período 1999-

2001 ocorreram surtos desta doença em vários estados brasileiros (Gráfico 1). Em 2001 e 2002, foram notificados 15766 e 5867 casos de rubéola em todo Brasil foram confirmados. A taxa de incidência de rubéola na população do Brasil em 2001, chegou a 5/100.000 mulheres, na faixa etária de 15 a 19 anos e a 6,3/100.000 mulheres, na faixa etária de 20-29 anos (Ministério da Saúde, Vigilância Epidemiológica). Nesse período observou-se um aumento progressivo no número de casos de síndrome da rubéola congênita (SRC), de 200 para 600 casos, refletindo o aumento da circulação do vírus na população adulta, bem como o aumento das estratégias de vigilância para a detecção de casos suspeitos. A vacinação de mulheres em idade fértil possibilitou uma importante redução dos casos de SRC, sendo a ocorrência de 13 casos registrados em todo o país, em 2003.

Gráfico 1. Distribuição do número de casos confirmado de rubéola no Brasil, 1993 a 2004.
Fonte: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Epidemiológica (ano 2005)

O Programa de Controle da Rubéola e da SRC foi implantado em 1992, com a realização da campanha estadual de vacinação e a aplicação da vacina tríplice viral em toda a população de um a dez anos de idade. A seguir, a

vacina foi incluída no calendário oficial do Estado de São Paulo, para ser aplicada simultaneamente, aos 15 meses, com o 1º. reforço da vacina DPT (contra difteria, coqueluche e tétano) e poliomielite. A cobertura vacinal atingida durante a campanha estadual foi de 95,7%. O objetivo desta campanha foi diminuir a força de infecção, com queda da circulação viral e conseqüente proteção às mulheres em idade fértil (MASSADI et al., 1995). Para manutenção desta situação as coberturas vacinais nas atividades de rotina, nos anos seguintes, deveriam manter-se elevadas e homogêneas. No entanto, cerca de 30 a 40% dos municípios do Estado, não atingiram a meta proposta, que era vacinar 95% das crianças com um ano de idade com a vacina tríplice viral. Esse fato, aliado à falha vacinal (5%), contribuíram para o aumento de suscetíveis. (CVE, 2010) (Gráfico 2).

Gráfico 2 . Distribuição do número de casos de rubéola e coeficiente de incidência (100.000 hab), no Estado de São Paulo, 1992 a 2004.
Fonte: Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, Centro de Vigilância Epidemiológica, Instituto Adolfo Lutz.

Na epidemia de 2000 que ocorreu no Estado de São Paulo, semelhante ao que ocorreu com o sarampo 1997, houve um deslocamento da

faixa etária de incidência da doença para a população de adultos jovens. A maior proporção dos 2.566 casos confirmados, ocorreu em pessoas de 20 a 29 anos de idade (58,6%), o risco de doença foi maior nesta faixa etária (23,7 casos/100 000 hab). (Gráfico 3).

Gráfico 3 Distribuição do número de casos por faixa etária, Estado de São Paulo em 2000.
Fonte: Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, Centro de Vigilância Epidemiológica, Instituto Adolfo Lutz.

A consequência destes surtos, com uma alta incidência entre adultos jovens, foi um aumento da incidência da SRC. Em 2000 foram confirmados pelo laboratório 138 casos de gestantes infectadas pelo vírus da rubéola (Gráfico 4). Entretanto, devido a sub-notificação da doença estes números podem representar apenas uma pequena parcela da real incidência (ANDRADE et al.,2006).

Gráfico 4. Distribuição do número de casos de gestantes e Síndrome da Rubéola Congênita confirmados no Estado de São Paulo, 1992 a 2004.

Fonte: Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, Centro de Vigilância Epidemiológica, Instituto Adolfo Lutz.

O principal objetivo do Plano Nacional de Controle da Rubéola é reduzir a incidência de casos, visando o controle da Síndrome da Rubéola Congênita. A Organização Panamericana da Saúde (OPAS), estabeleceu como meta, em junho de 2003 a eliminação da rubéola e da SRC nas Américas, até o ano 2010 (Figura 5).

Figura 5 Resolução do Comitê Executiva da OPAS, 132ª Sessão Junho- 2003.
Fonte: Organização Panamericana de Saúde (OPAS). (Ano 2003).

No Estado de São Paulo uma campanha de vacinação contra a rubéola foi realizada, em novembro de 2001, para todas as mulheres na faixa etária dos 15 aos 29 anos de idade (CVE, 2001). Após a realização da campanha, verificou-se uma queda no número de casos confirmados de rubéola; em 2002 foram notificados 277 casos (0,73 casos/100 000 hab). (Gráfico 2).

A rubéola, entretanto, ainda é um problema de saúde pública, com impacto no orçamento de vários países. No período de 1998 a 2006, 40 países e territórios, representando cerca de 90% da população da Região das Américas utilizaram estratégias de vacinação em massa para crianças, adolescentes e adultos com o objetivo de interromper rapidamente a transmissão do vírus da rubéola e prevenir a SRC (TINGLE, 1997; PAHO, 2002; CASTILLO-SOLORZANO et al., 2003; MULLER et al., 2007). O número de casos confirmados de rubéola diminuiu em 99% em 2004 nas Américas (Gráfico 5).

Gráfico 5 Distribuição dos casos notificados de Rubéola nas Américas, 1980–2004.
Fonte: Organização Panamericana de Saúde. (ano 2005).

Durante a 27ª Conferência Sanitária Pan-Americana e 59ª sessão do Comitê Regional, realizada em outubro de 2007 em Washington D.C., foram reconhecidos os avanços alcançados na região e aprovada a formação de um comitê técnico responsável pela documentação e comprovação da interrupção da transmissão do vírus endêmico do sarampo e da rubéola nas Américas.

Entretanto, em 2006, em vários estados do Brasil, foi observado um aumento significativo do número de casos confirmados de rubéola. Os surtos inicialmente ocorreram nos estados de Rio de Janeiro e Minas Gerais. A disseminação do vírus ocorreu durante todo o ano de 2007, afetando 20 dos 27 estados, totalizando 8.156 casos confirmados, distribuídos nas regiões Sudeste, Sul, Nordeste e Centro-Oeste. Em 2007, no período que se estende de janeiro a 15 de dezembro, foram confirmados surtos de rubéola em 19 (70%) estados brasileiros, em 478 (8,6%) dos municípios, perfazendo um total de 6.885 casos confirmados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). A distribuição dos 6.885 casos confirmados manteve o padrão do início do surto, A distribuição dos casos confirmados configurou-se durante todo o surto, ou seja, 5.992 (69%) casos confirmados no sexo masculino. A faixa etária mais acometida em ambos os sexos

é a de 20 a 29 anos de idade com 4.507 (52%) dos casos, seguida pelas faixas etárias de 30 – 39 anos com 1.634 (18,9%) e de 12 - 19 anos com 983 (11,5%) casos confirmados (Coordenadoria de Controle de Doenças, 2007).

Em São Paulo, durante o ano de 2007, foram confirmados 1.627 casos de rubéola, sendo 886 (57%) em homens adultos, na faixa etária de 20 - 39 anos. Em 2008, foram confirmados 746 casos de rubéola (Gráfico 6) (Coordenadoria de Controle de Doenças, 2007). Entre 2007 e 2008, foram notificados 33 casos suspeitos de Síndrome da Rubéola Congênita e um caso de óbito fetal por rubéola em mulher não vacinada, natural do Maranhão (ANDRADE et al., 2010).

Gráfico 6. Distribuição do número de casos de rubéola no Estado de São Paulo 2000 a 2008.
Fonte: Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, Centro de Vigilância Epidemiológica, Instituto Adolfo Lutz.

Em 2008, no período de 9 de agosto a 12 de setembro, ficou estabelecida a realização de outra campanha nacional de vacinação, dessa vez para homens e mulheres entre 20 e 39 anos de idade. Foram aplicadas 6.544.911

doses da vacina contra a rubéola (tríplice viral e dupla viral) para indivíduos maiores de 12 anos de idade, de acordo com Coordenação Nacional do Programa de Imunizações. O intuito desta vacinação foi atingir a meta que foi estabelecida pela OPAS para a eliminação da rubéola e da Síndrome da Rubéola Congênita em 2010.

2.4 Genótipos da Rubéola

A epidemiologia molecular tem sido utilizada no auxílio do controle e monitoramento das doenças virais, pois a variabilidade da sequência nucleotídica de um agente etiológico permite sua classificação dentro de grupos e posteriormente, em genótipos. Os genótipos do vírus da rubéola foram determinados a partir da análise da glicoproteína E1 do vírus da rubéola. A taxonomia da rubéola consiste de dois grupos: 1 e 2 (FREY et al., 1998; KATOW S., 1998; ZHENG et al., 2003a.; WHO, 2005). O grupo 1 é formado por 7 genótipos do vírus da rubéola (1a, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F e 1G) e o grupo 2 por três genótipos (2A, 2B, 2C) (WHO, 2005; 2007). Os genótipos designados em letras minúsculas, são considerados provisórios, porque o número limitado destes vírus dificulta a sua caracterização. A variação nucleotídica é de 5,8% e 8,0% para o grupo 1 e 2 respectivamente (ZHENG et al., 2003a; 2003c). Geograficamente, os vírus do grupo 1 circulam em todo o mundo, enquanto do grupo 2, estavam limitados a região Asiática, porém, isto foi modificado durante as epidemias de rubéola que ocorrem a partir do ano de 2006, onde foi encontrado o genótipo 2B em vários países da Europa e região das Américas (VALINOTTO et al., 2010; ANDRADE et al., 2010; CURTI, 2008).

O genótipo 1a compreende todos os vírus que circularam na década de 60, entretanto, este genótipo tem sido encontrado em Myanmar, Mongólia e Brasil (ZHENG et al., 2003a, 200c ; WHO, 2005, 2007; THANT et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2008; 2010). O genótipo 1G tem sido encontrado na África, Rússia, Europa, etc (CAIDI et al., 2008; WHO, 2007, 2005). Os genótipos 1B, 1C e 1E tem sido encontrado na América do Sul, Japão, África, China e Filipinas; 1D Ásia, Etiópia, Canadá e USA; 1F na China (WHO 2005, 2007). O genótipo 1C foi encontrado durante uma epidemia de rubéola que ocorreu no Japão que posteriormente, surgiu nas Américas. Em 2007, três novos genótipos provisórios

foram adicionados: 1h, 1i, 1j. Em relação aos novos genótipos provisórios, o genótipo 1i foi identificado na Itália nos anos de 1992 e 1994, respectivamente e após este períodos, nenhum vírus deste genótipo foi encontrado, portanto este genótipo é considerado provisório e inativo. O genótipo 1j foi identificado nos Estados Unidos e no Japão e o genótipo 1h foi identificado na região de Belarus na Rússia.

Figura 6. Distribuição dos genótipos do vírus da rubéola no mundo, no período de 1995-2008.

2.5 Transmissão

A rubéola é uma doença exantemática aguda e ocorre predominantemente na infância e na adolescência. Tem distribuição universal e a incidência de casos aumenta no final do inverno e no início da primavera.

A transmissão ocorre por contato direto com indivíduos infectados por meio das gotículas de secreções da nasofaringe. A transmissão por meio de objetos contaminados é pouco frequente. O indivíduo infectado pode transmitir a doença cerca de cinco dias antes e 7 dias após o aparecimento do exantema. Recém-nascidos com rubéola congênita podem eliminar o vírus pela urina e secreções nasofaríngeas por um período superior a um ano, sendo o risco de transmissão mais importante nos primeiros meses de vida. Todos os recém nascidos devem ser considerados excretadores do vírus nos três primeiros meses de vida. O período de incubação varia de 12 a 23 dias, sendo em média 17 dias (COOPER et al., 1995).

2.6 Aspectos Clínicos

2.6.1 Infecção Adquirida Pós Nascimento

A infecção pelo vírus da rubéola em uma criança ou em um adulto é caracterizada por um exantema máculo-papular discreto, em comparação com o sarampo e a escarlatina, com duração de três dias e distribuição crânio-caudal. À medida que atinge os membros inferiores, começa a desaparecer da face, mas permanece coalescente apenas no tronco. Nas crianças, geralmente, não há pródromos, mas em adolescentes e adultos, cerca de um a cinco dias antes do início do exantema, observa-se febre baixa, tosse, coriza, cefaléia, mal estar e linfadenopatia. Embora o exantema seja o aspecto mais característico da doença, este sintoma pode ser produzido por outras infecções ou mesmo por drogas, desta forma, exceto nos períodos epidêmicos, o diagnóstico clínico da rubéola é difícil. Estudos tem mostrado quadro clínicos clássicos de rubéola como sendo outras doenças e, inversamente, casos atípicos como sendo rubéola verdadeira (BARON, 1996; HOBMAN; CHANTLER, 2007;). Em adultos, no entanto, a doença pode ser mais grave, como poliartralgia e poliartrite (HERRMANN, 1995; SANTIS et al.,

2005). Outras complicações são encefalite (1:6000 casos) com uma taxa de mortalidade de 50%, trombocitopenia com manifestação hemorrágica (1:3000 casos), Síndrome de Guillain-Barré, hepatite fulminante, neurites, encefalites, conjuntivites, orquites (HOBMAN; CHANTLER, 2007; FIGUEIREDO et al., 2008, 2010a,b).

2.6.2 Infecção Congênita

A patogênese da SRC inicia-se com a viremia materna, atingindo a placenta, e em seguida, pela migração das células infectadas, é transmitida rapidamente para o feto. O risco de infecção e da SRC decresce com o aumento da idade gestacional. A teratogenicidade do vírus da rubéola é inquestionável, mas o mecanismo de acometimento ainda não foi totalmente esclarecido. A replicação viral pode levar a anormalidades mitocondriais, alterações no esqueleto celular e apoptose (LEE; BOWDEN, 2000).

Atualmente, é reconhecido que, quando a infecção ocorre nas primeiras oito semanas de gestação, as anormalidade decorrentes dessa infecção são geralmente graves. O retardo na organogênese e a desorientação celular levam aos defeitos estruturais característicos: lesões ósseas, hepáticas, encefalite, trombocitopenia púrpura e o retardo psicomotor progressivo frequentemente observado à medida que a criança cresce (LEE; BOWDEN, 2000)

A infecção do feto inicia-se nos tecidos placentários (córion), induzindo necrose celular nas células epiteliais e endoteliais. As células endoteliais descamadas vão para o lúmen dos vasos e daí, são transportadas para a circulação fetal. A lesões aparecem 10 dias após o exantema materno (TONDURY; SMITH, 1966; CHANTLER; WOLINSKY; TINGLE; 2001). Os órgãos mais acometidos são: fígado, miocárdio e órgão de Corti (PLOTKIN E VAHERI, 1967; YONEDA, 1986). A rubéola congênita pode resultar em morte fetal, nascimento com anomalias, e nascimento de crianças normais sem evidência de infecção (KATOW, 1998; WEBSTER, 1999; ANDRADE et al., 2006). A tríade de anormalidades anatômicas são: catarata, surdez e lesões cardíacas, mas também, podem ser observadas trombocitopenia, hepatite, microcefalia, retardo do crescimento, lesões dos ossos longos, retinite, encefalite, panencefalite, hepatomegalia, diabetes melito, tireoidite (HOBMANN; CHANTLER, 2007). As manifestações clínicas podem ser

comuns, transitórias e pouco freqüentes (Tabela 1) (HOBMANN; CHANTLER , 2007). A criança intra útero pode permanecer cronicamente infectada por meses após o nascimento; nascer aparentemente normal e mais tarde desenvolver exantema rubeliforme crônico, encefalopatia, pneumonite intersticial, retardo psicomotor e surdez. Além disso, alguns pacientes com a SRC desenvolvem Panencefalite Progressiva da Rubéola (PPR), após a doença congênita ou adquirida. Estes pacientes apresentam deteriorização intelectual e distúrbio comportamental semelhante ao da panencefalite esclerosante subaguda do sarampo (PESS). A patogênese da panencefalite por rubéola é desconhecida, entretanto alguns estudos mostraram não se tratar de doença imunológica ou de desmielinização progressiva. Os pacientes vivem de 6 a 18 meses em franca deteriorização cerebral, até entrar em coma e ir a óbito (COOPER; PRELUB; ALFORD, 1995; FREY, 1997).

Tabela 1- Manifestações clínicas da Síndrome da Rubéola Congênita: comuns, transitórias e pouco freqüentes.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS		
COMUNS	TRANSITÓRIAS	POUCO FREQUENTES
Catarata e microftalmia	Baixo peso ao nascer	Glaucoma
Retinopatia	Fontanela anterior aumentada	Miopia sevrá
Surdez, neurosensorial	Hepatoesplenomegalia	Criptoquirdia
Distúrbios de linguagem	Adenopatia generalizada	Hérnia inguinal
Retardo Mental	Miocardite	Diabete
Persistência Ducuts	Hepatite	Tireoidite
Arteriosus	Anemia hemolítica	Deficiência GH*
Estenose de artéria	Meningoencefalite	
Diplegia espática	Púrpura trombocitopênica	

GH: Hormônio do crescimento

2.6.3 Resposta Imune Fetal

A infecção do vírus da rubéola na gestante, se inicia antes do desenvolvimento da resposta imune materna, o vírus se espalha por via hematogênica, atingindo múltiplos tecidos maternos e até mesmo a placenta. A produção dos anticorpos pela gestante provoca o desaparecimento do vírus na corrente sanguínea, porém, podendo permanecer durante meses na placenta (TONDURY; SMITH, 1966; RAWLS, 1968).

No início da gestação, o feto infectado é incapaz de se defender, pois a transferência de IgG materna para o feto pela placenta se inicia somente na metade da gravidez. Na 6ª semana de gestação, pode ser detectada imunoglobulinas da classe IgG no líquido celômico, mas essa imunoglobulina parece ser ineficiente nessa fase. No primeiro trimestre de gestação, as imunoglobulinas circulantes no sangue fetal correspondem de 5 a 10% do nível materno. A taxa de transferência materno-fetal de imunoglobulinas aumenta progressivamente com a idade gestacional e a IgG no cordão umbilical, pode exceder o da mãe (PREBLUD; ALFORD, 1990). Estudos realizados por Meitsch et al (1997), entre recém nascidos com SRC e recém-nascidos infectados mas sem sintomas ao nascimento mostrou que os recém nascidos com SRC demonstraram baixos títulos de anticorpos direcionados para as proteínas E1 e E2 do vírus da rubéola e, nos assintomáticos, títulos normais desses anticorpos, sugerindo uma deficiência na resposta imune, tanto na humoral quanto na celular (MEITSCH et al., 1997; PUSTOWOIT; LIEBERT, 1998; HOFMANN; LIEBERT, 2005).

2.7 Vacinas

A primeira vacina da rubéola foi desenvolvida por Parkman et al (1969) utilizando o vírus atenuado cultivados em células de rim de macaco verde africano (VERO) e foi chamada de HPV-77. Posteriormente, a Merck produziu a vacina HPV-77 DE-5 que foi obtida após sucessivas passagens do vírus atenuado em embrião de patos, sendo a primeira vacina licenciada para uso nos Estados Unidos. Essa vacina mostrou-se bem tolerada, segura e imunogênica (LEE; BOWDEN, 2000). Huyglen e Peetrmans a seguir, desenvolveram na Bélgica a cepa Cendehill a

qual foi cultivada em células de rim de coelhos por diversas passagens. A terceira vacina (wistar RA 27/3) foi desenvolvida por Plotkin em 1965, porém só foi liberada em 1979 nos EUA. A partir desta data, a vacina HPV-77 foi retirada do mercado e a vacina RA27/3 é hoje a única licenciada, tanto na forma monovalente como combinada com as vacinas para sarampo e caxumba, recebendo a denominação de vacina tríplice viral (HORSTMAN, 1976; Baron, 1996). A cepa RA27/3 é mais imunogênica e menos reatogênica que a HPV-77 e a Cendehill (PLOTKIN, 1973, 2004), e por isso hoje quase todos os países do mundo a utilizam, com exceção no Japão que dispõe de cinco outras cepas: Matsubara, TCRB19, Takahashi, Matsubara e TO-336 (UEDA, 2009).

Os níveis de anticorpos induzidos pelas vacinas são mais baixos do que os produzidos pela doença adquirida naturalmente, aproximadamente 95% das pessoas vacinadas tem soro conversão entre 14 e 28 dias após a vacinação. Porém como todas as vacinas, a duração da proteção é uma questão preocupante. Estudo realizado por Davidikin et al., (2008) mostrou que após 20 anos os níveis de anticorpos para rubéola persistem somente em indivíduos que receberam as duas doses de MMR. Entretanto, estudos mostram que uma pequena proporção da população pode não desenvolver a produção de anticorpos protetores (HOBMANN; CHANTLER, 2007).

A vacinação contra a rubéola é o meio mais eficaz de prevenir contra a infecção pelo vírus. No atual calendário de vacinação do Programa Nacional de Imunizações é aplicada de forma combinada com as vacinas contra o sarampo e caxumba (vacina tríplice viral), aos 12 meses de idade, com uma segunda dose entre quatro e seis anos de idade. O objetivo da segunda dose é principalmente imunizar as crianças que apresentem falha vacinal primária (cerca de 5%), após a primeira dose.

A vacina da rubéola é bem tolerada e pouco reatogênica. No entanto algumas pessoas vacinadas poderão apresentar reações locais (dor, edema, rubor e calor), febre e exantema (entre o 5º e 12º dia após a vacinação), linfadenopatia (entre o 5º e 12º dia), dor articular (7º e 21º dia) e reações imediatas de hipersensibilidade. As reações adversas relacionadas com artralgia, artrite aguda, geralmente transitória, ocorrem em 10%-30% das mulheres vacinadas com RA 27/3 (TINGLE, 1997; MITCHELL et al., 1993; POLK, 1982;). OU et al.1993, mostraram a existência de uma associação de determinados haplótipos HLA DR, com uma

maior incidência de sintomas articulares após vacinação com RA27/3, sugerindo que o vírus da rubéola atenuado pode causar sintomas de artrite e artralgia em indivíduos geneticamente predispostos.

Durante os últimos anos, a associação da vacina MMR (sarampo/caxumba/rubéola) com o autismo, prejudicou os programas de imunização em alguns países (CHEZ; CHIN; HUNG, 2004; COFFIN, 2002). Chen et al., 2004, realizaram um estudo retrospectivo, no qual foram analisados aproximadamente 2.000 pacientes com mais de 30 anos, os quais receberam vacinação com MMR ou tiveram infecção natural, para determinar se houve aumento na incidência de autismo neste grupo, os resultados mostraram que não houve qualquer aumento de autismo relacionado com a vacina ou com a infecção natural.

A vacinação em gestantes, pessoas com imunodeficiência congênita ou adquirida (exceto as crianças infectadas pelo vírus HIV assintomáticas), naquelas com neoplasias malignas, nas pessoas em tratamento com corticóides em doses elevadas (equivalente a prednisona na dose de 2 mg/kg/dia ou mais, por mais de suas semanas) ou submetidas a terapêuticas imunodepressoras (quimioterapia, radioterapia, etc) ou com história de reação anafilática em doses anteriores ou a qualquer componente da vacina é contra-indicada, por se tratar de uma vacina atenuada.

Em 2001, no Estado de São Paulo, houve uma campanha de vacinação em massa, onde 6.473 mulheres gestantes foram vacinadas inadvertidamente. Após acompanhamento e triagem, 811 gestantes que eram susceptíveis, foram acompanhadas até o momento do parto. As amostras de sangue de 27 recém-nascidos, apresentavam sorologia IgM reagente para o vírus da rubéola, entre estes recém-nascidos, uma avaliação completa foi realizada em 18 e nenhum apresentou malformações compatíveis com a SRC (SATO, 2010).

2.8 Reinfecção

A reinfecção por rubéola em indivíduos vacinados ou em gestante é rara, podendo ocorrer em indivíduos após a imunidade adquirida pela infecção natural ou induzida pela vacina. As manifestações clínicas são geralmente suaves, porém alguns indivíduos apresentam linfadenopatia, exantema ruboliforme e artropatia . Na reinfecção, ao contrário da infecção primária, a resposta imunológica consiste no aumento de IgG, cujos níveis elevam-se rapidamente logo após o contágio. Normalmente, não ocorre resposta tipo booster com base na IgM; altos títulos desse anticorpo surgem apenas na infecção primária. Vale ressaltar que técnicas sensíveis, como o ELISA de captura, podem detectar baixos níveis de IgM específica em alguns pacientes com reinfecção, sendo difícil a diferenciação da infecção primária. Nesses casos, a determinação da avidéz da IgG pode trazer subsídio ao diagnóstico, pois na infecção primária ocorre baixa avidéz, enquanto na reinfecção a mesma é elevada (HAMKAR et al., 2009,2005).

Os casos de reinfecção ocorrem com mais freqüência em indivíduos com ou alteração da imunidade (defeitos no mecanismo humoral ou células mediadas) ou falha vacinal (HORSTMANN 1970, 1969; MORGAN-CAPNER et al., 1985a; CUSI et al., 1990,1993; BARFIELD et al., 1997; BEST; BANATVALA,2000).

Apesar de existirem poucos casos relatados na literatura, onde a infecção fetal ocorreu após uma reinfecção materna, estudos mostraram que o risco de infecção fetal nesse casos, pode chegar a 9% (MORGAN-CAPNER et al., 1985a; FOGEL et al., 1996; BEST, 2007). Aboudy et al. (2000) relataram uma reinfecção em uma gestante vacinada no qual, o recém-nascido não apresentou qualquer sequela após o nascimento. Por outro lado, Alem et al. (1998), apresentaram o relato de uma gestante infectada cujo recém-nascido apresentou catarata bilateral. A SRC foi confirmada pelo alto título de avidéz da mãe.

2.9 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial para um paciente com suspeita de infecção pelo vírus da rubéola pode ser iniciado por testes sorológicos no soro. A grande maioria dos casos de infecção pelo vírus da rubéola são manifestações subclínicas e o diagnóstico diferencial em casos de doença exantemática é extremamente importante. A análise sorológica baseada nos achados de anticorpos específicos, em particular, IgM, IgG e avidéz de IgG são os mais pesquisados. A infecção aguda da rubéola é caracterizada pelo aparecimento de anticorpos específicos IgM, presentes em 5 dias após o exantema e o aumento progressivo de títulos de anticorpos IgG. Além disso, após uma semana, as classes de imunoglobulinas, incluindo IgA, IgD e IgE estão presentes (CHANTLER; WOLINSKY; TINGLE; 2001; HOBMAN; CHANTLER, 2007).

A investigação sorológica é realizada pelo teste imunoenzimático (ELISA), porém, outros testes podem ser usados, como os testes de inibição de hemaglutinação (IH) e imunofluorescência (IF), porém a confirmação, em casos positivos, é feita pelo teste de ELISA (CVE, 2010; HOBMAN; CHANTLER, 2007). A proteína E1 do vírus da rubéola induz a formação de anticorpos neutralizantes e inibidores de hemaglutinação, os quais persistem por toda a vida, além disso, os anticorpos fixadores de complemento podem ser detectados de 7 a 10 dias após o exantema viral e não permanecem mais do que dois anos no soro dos pacientes.

Atualmente, vários laboratórios tem utilizado a técnica de pesquisa de avidéz de anticorpos para diferenciar infecção recente da infecção passada (HAMKAR., et al., 2005, 2009; BEST 2007; VAULOUP-FELLOUS et al. 2007). Este teste baseia-se na constatação de que a avidéz de anticorpos para o seu alvo antigênico aumenta com o tempo, refletindo a maturação da resposta imune, pela inclusão de um detergente suave, como dietilamina ou uréia em tampão de lavagem de um padrão de teste de ELISA IgG, a avidéz de IgG pode ser medida. A identificação de anticorpos de baixa avidéz (índice de avidéz igual ou inferior a 30%), sugere infecção primária recente.

O isolamento viral, ainda é considerado o *gold standard* para o diagnóstico de infecção pelo vírus da rubéola. As células mais utilizadas para o isolamento primário do vírus da rubéola são VERO (rim de macaco verde africano), BHK-21 (rim de hamster), SIRC (córnea de coelho), RK-13 (rim de coelho) e

atualmente, VERO-SLAM (rim de macaco verde africano-*Signaling linfocyte activite molecular*). O crescimento do vírus da rubéola é lento e além disso, o seu efeito citopático nem sempre é observado. As culturas de células inoculadas são observadas durante 8 dias ou até o aparecimento do efeito citopático. Após este período, as culturas que não apresentaram efeito citopático, são inoculadas em novas passagens celulares até o surgimento do efeito citopático. As células são repassadas até quatro passagens até o surgimento ou não de efeito citopático, sendo posteriormente, submetidas as técnica de PCR para identificação do agente isolado (FIGUEIREDO et al., 2004, 2009; HOBMAN; CHANTLER, 2007).

O isolamento viral é indicado em situações clínicas que incluem, casos suspeitos de rubéola nos quais não há possibilidade de confirmação sorológica ou quando há complicações graves (encefalite, artrite, síndromes) e como indicativo da persistência da infecção viral (FREY, 1997; CHANTLER; WOLINSKY; TINGLE 2001; FIGUEIREDO et al., 2008, 2009).

As técnicas de amplificação de ácidos nucleicos foram desenvolvidas na década de 1990 para a detecção de RV em amostras clínicas (HOTERRY;TERRY, 1990; BOSMA 1995a,b.; CHANTLER et al., 1997; KATOW, et al., 1998). Estudos realizados por BOSMA et al. (1995b), analisando material de interrupção de gestação (placenta e tecidos fetais), detectaram o vírus da rubéola em 67% dos casos, com infecção nas primeiras 12 semanas de gestação pelo método de PCR e, quando associaram o PCR e isolamento viral, detectaram o vírus em 70% dos casos. Revello et al. (1997), estudando 20 amostras de autópsias de casos de rubéola congênita utilizando a técnica de PCR detectou 15 casos (75%), o isolamento viral 6 (20%). Oliveira et al. (2001), utilizando a técnica de PCR usando como amostra clínica soro de pacientes com suspeita de rubéola detectou o vírus em 80% dos casos. Andrade et al.(2006), analisaram por nested PCR, entre janeiro de 1999 e dezembro de 2002, o líquido amniótico e tecidos fetais de mulheres grávidas com sinais clínicos de rubéola e presença de anticorpos específicos, os resultados revelaram alta positividade para o vírus da rubéola. Os métodos diretos para o diagnóstico fetal, como o PCR são, essenciais para o diagnóstico precoce de infecção fetal.

2.10 Diagnóstico da Síndrome da Rubéola Congênita (SRC)

O diagnóstico para SRC pode ser realizado usando os testes sorológico, isolamento viral e PCR (CHANTLER; WOLINSKY; TINGLE, 2001; RAJASUNDARI et al., 2008; BEST, 2007; JIN; THOMAS, 2007). Os recém-nascidos afetados pelo vírus da rubéola possuem anticorpos circulantes, pois durante o período de gestação, a mãe infectada pelo vírus, desenvolve anticorpos da classe IgM e IgG, porém só transmite ao recém-nascido os anticorpos IgG, os quais atravessam a placenta. Durante a infecção, o feto é capaz de produzir anticorpos da classe IgM, evidenciando assim, uma infecção congênita. A detecção de anticorpos IgM no recém nascido pode ser realizada usando o sangue do cordão umbilical ou no soro do recém-nascido. A duração e persistência dos anticorpos da classe IgM parecem estar relacionados com o tempo da infecção crônica (COOPER; PRELUB; ALFORD 1995; HOBMANN; CHANTLER, 2007).

Os anticorpos específicos da classe IgG, também, são produzidos pelos recém-nascidos infectados, porém a diferenciação entre os IgG produzidos pela mãe é extremamente difícil. Após, o nascimento, o nível de anticorpos da classe IgG da mãe tem uma meia vida de um mês, a presença de IgG em altos níveis, após este período, é altamente sugestivo de infecção intra-uterina (HOBMANN; CHANTLER, 2007). O diagnóstico é positivo para SRC quando há presença de anticorpos da classe IgM depois do nascimento ou a persistência de IgG na amostra de sangue da criança, colhida após um ano de vida (MILLER; CRADOCK-WATSON, 1982).

Além disso, os testes de avidéz para os anticorpos IgG tem sido utilizado para demonstração de infecção recente ou não (BOTTIGGER et al., 1997; CONDORELLI et al., 1999). Em conjunto com os testes de avidéz, a técnica de PCR tem sido utilizadas para o diagnóstico de SRC (JIN et al., 2007; RAJASUNDARI et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterização molecular do vírus da rubéola no Estado de São Paulo no período de 1997 a 2004.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Otimização de técnicas de isolamento viral em amostras biológicas de pacientes
com suspeita de infecção pelo vírus da rubéola.
- b) Detecção do RNA do vírus da rubéola na população de estudo
- c) Seqüenciamento dos fragmentos de DNA do vírus da rubéola detectados
- d) Analisar por filogenia os vírus da rubéola que circulam no Estado de São Paulo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

A população de estudo foi constituída por 29 pacientes com suspeita de rubéola que foram aos Postos de Saúde ou Hospitais para coleta de sangue, para a realização do diagnóstico sorológico, isolamento viral e posterior análise molecular (Figura 7). A Seção de Vírus Produtores de Exantemas do Instituto Adolfo Lutz, é referencia estadual do Programa de Controle da Rubéola e da Síndrome da Rubéola Congênita recebendo diariamente amostras de todo o Estado de São Paulo. O principal objetivo da Seção de Vírus Produtores de Exantemas é o diagnóstico diferencial das doenças virais, particularmente aquelas relacionadas a quadros exantematicos. As amostras foram selecionadas de pacientes apresentando sintomas e sinais sugestivos de infecção pelo vírus da rubéola.

Figura 7. Fluxograma do diagnóstico laboratorial para os pacientes com suspeita de infecção pelo vírus da rubéola.

4.2 Pacientes

O estudo foi realizado com amostras clínicas colhidas nos Postos de Saúde e Hospitais e enviadas para Seção de Vírus Produtores de Exantemas do Instituto Adolfo Lutz no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2004 (Figura 7). Foram selecionadas amostras de 29 pacientes de ambos os sexos e idades entre 4 dias e 35 anos, com sintomas e sinais sugestivos de infecção pelo vírus da rubéola, exceção do caso nº3 com suspeita de hepatite fulminante pelo vírus da rubéola e do caso nº4 com suspeita de encefalite viral. Entre os pacientes analisados, dois pacientes com quadro clínico sugestivo de SRC (Síndrome da Rubéola Congênita), um paciente com suspeita de ICR (Infecção Congênita por Rubéola) e 4 pacientes com suspeita de reinfecção pelo vírus da rubéola (Tabela 2). Os pacientes com suspeita de reinfecção, dois apresentaram a carteira de vacinação comprovando que no ano de 2001 tomaram a vacina RA27/3 (casos nº 27 e 28) e os outros dois pacientes, apresentaram exame com resultado de IgM positivo, confirmando infecção primária pelo vírus da rubéola (casos nº 22 e 29). (Tabela2)

Tabela 2- Relação dos casos que foram analisados e selecionados para o sequenciamento gênico

Paciente Caso n°	Identificação	Amostra	Idade	Data do Exantema	Data da Coleta	Vacinação	Diagnóstico Clínico
1	RVi/SP01.BRA/97	urina	20D	07/09/1997	08/09/1997	S/Informação	rubéola
2	RVi/SP01.BRA/98	sangue	04D	sem exantema	05/03/1998	Não vacinado	CRS (RN)
3	RVi/SP01.BRA/99	sangue/explante fígado	2A	sem exantema	28/03/1999	S/informação	hepatite fulminante
4	RVi/SP02.BRA/99	sangue/LCR	17A	10/05/1999	15/05/1999	Não vacinado	encefalite
5	RVi/SP03.BRA/99	sangue	21A	10/06/1999	11/06/1999	Não vacinado	rubéola
6	RVi/SP01.BRA/00	sangue	20A	17/08/2000	20/08/2000	Não vacinado	rubéola
7	RVi/SP2.BRA/00	urina	20A	19/08/2000	23/08/2000	Não vacinado	rubéola
8	RVi/SP3.BRA/00	sangue	22A	21/08/2000	25/08/2000	Não vacinado	rubéola
9	RVi/SP4.BRA/00	urina	20A	28/08/2000	29/08/2000	S/Informação	rubéola
10	RVi/SP5.BRA/00	sangue	24A	20/08/2000	25/08/2000	Não vacinado	rubéola
11	RVi/SP6.BRA/00	sangue	25A	22/08/2000	26/08/2000	Não vacinado	rubéola
12	RVi/SP7.BRA/00	urina	23A	23/08/2000	25/08/2000	Não vacinado	rubéola
13	RVi/SP8.BRA/00	sangue	17A	25/08/2000	29/08/2000	Não vacinado	rubéola
14	RVi/SP9.BRA/00	sangue	23A	25/09/2000	26/09/2000	S/Informação	rubéola
15	RVi/SP.10/BRA00	urina	23A	15/10/2000	18/10/2000	S/Informação	rubéola
16	RVi/SP11.BRA/00	sangue	34A	13/10/2000	20/10/2000	Não vacinado	rubéola
17	RVi/SP12.BRA/00	urina	28A	08/11/2000	09/11/2000	Não vacinado	rubéola
18	Rvi/SP13..BRA/00	sangue	26A	15/12/2000	17/12/2000	Não vacinado	rubéola
19	Rvi/SP14..BRA/00	sangue	22A	20/12/2000	23/12/2000	Não vacinado	rubéola
20	RVi/SP01.BRA/01	sangue	24A	31/08/2001	31/08/2001	Não vacinado	rubéola
21	RVi/SP02.BRA/01	urina	22A	02/09/2001	06/09/2001	Não vacinado	rubéola
22	RVi/SP01.BRA/02	urina	23A	10/01/2002	13/01/2001	Vacinado	reinfeção
23	RVi/SP02.BRA02	sangue	27A	28/01/2002	29/01/2002	Não vacinado	(Mãe)
24	RVi/SP03.BRA02/CRS	sangue	08D	sem exantema	29/01/2002	Não vacinado	*SRC(RN)
25	RVi/SP04.BRA02/CRI	produto aborto		sem exantema	01/11/2002	Não vacinado	*ICR
26	RVi/SP01.BRA/03	swab de orofaringe	3	15/08/2003	18/08/2003	S/Informação	rubéola
27	RVi/SP01.BRA/04	urina	19	12/04/2004	15/04/2004	Vacinado	reinfeção
28	RVi/SP02.BRA/04	urina	16	16/08/2004	17/08/2004	Vacinado	reinfeção
29	RVi/SP03.BRA/04	urina	35	16/09/2004	20/09/2004	Vacinado	reinfeção

D - Dias

A- Anos

SRC- Síndrome da Rubéola Congênita

ICR- Infecção Congênita por Rubéola

S/Informação- Sem informação

4.3 Coleta das Amostras

O estudo foi realizado em 18 amostras de sangue, 9 amostras de urina, 1 produto de aborto, 1 swab da orofaringe, 1 líquido cefalorraquidiano e 1 explante de fígado (Tabela 1). A figura 5 mostra o fluxograma do procedimento realizado após o recebimento das amostras. As amostras de sangue (10mL), foram obtidas por punção venosa, via antecubital, com sistema de coleta a vácuo utilizando tubo com anticoagulante para a realização da sorologia e sem anticoagulante, para o isolamento viral. Nos pacientes menores de 1 ano, foram colhidos, apenas 3mL de sangue. As amostras de urina (15 mL) foram colhidas em coletores de urina ou tubo de polipropileno esterilizado e o líquido cefalorraquidiano (10 mL) foi obtido por punção lombar em tubo de polipropileno esterilizado. O swab da orofaringe foi colhido em tubo estéril contendo meio de transporte (solução salina tamponada pH 7,2, contendo 2% de soro fetal bovino, 0.02% Tween 20, 100µg/mL gentamicina e 2µg/mL fungizone. O produto de abortamento (restos placentários) foi colhido no momento da expulsão, sendo acondicionado em recipiente contendo soro fisiológico. O explante de fígado foi obtido durante cirurgia. Todas as amostras foram enviadas ao Instituto Adolfo Lutz, para a Seção de Vírus Produtores de Exantemas em caixa de isopor com gelo reciclável, sendo imediatamente processadas ou armazenadas a -80 °C.

4.4 Processamento das Amostras

4.4.1 Soro

O soro foi separado após centrifugação a 1.800g por 5 minutos a 4 °C. Após a separação do soro, as amostras foram armazenadas em alíquotas, utilizando-se microtubos devidamente identificados e mantidos a temperatura de -20 °C até a data do seu processamento.

4.4.2 Células Mononucleares

As amostras de sangue colhidas em tubos com heparina, diluídas em solução salina e adicionadas a um gradiente de separação por centrifugação 2.500 g por 20 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, os linfócitos foram removidos e transferidos para outro tubo de polipropileno, ao qual adicionou-se 8 mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01M, pH 7,2, (PBS) a 1.300g. Este procedimento foi realizado três vezes e após a última centrifugação, as células foram ressuspensas em 1mL de meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco's) contendo 2% de soro fetal bovino (Invitrogen, EUA). As células foram mantidas a -80 °C até o uso.

4.4.3 Urina e Swab de Orofaringe

As amostras de urinas foram centrifugadas a 2.500 g por 20 minutos a 4 °C e o sedimento foi ressuspenso em 1mL de meio de cultura (DMEM) contendo 100 µg/mL gentamicina e 100 U/mL de eritromicina armazenadas a -80 °C. Nas amostra de urina o pH da amostra foi corrigido para 7,2 utilizando bicarbonato de sódio. A amostra de swab de orofaringe foi armazenada a -80 °C.

4.4.4 Líquido Cefalorraquidiano

O líquido cefalorraquidiano foi colhido e enviado ao Instituto Adolfo Lutz após confirmação da sorologia para o vírus da rubéola. A amostra foi enviada em gelo e armazenada a -80 °C.

4.4.5 Explante de Fígado

O explante de fígado colhido durante a cirurgia, totalmente livre de outros tecidos, foi processado para a realização de RT-PCR, coloração por Hematoxilina-eosina e imunohistoquímica.

Para a RT-PCR a amostra foi lavada duas vezes em solução salina tamponada pH 7,5. Após a lavagem, o explante fígado foi picado em pedaços aproximados (0,3x0,3)cm e lavados duas vezes em solução salina tamponada. Aos pedaços de fígado foi adicionado 800 μ L RNAzol™ (Invitrogen, EUA) e armazenado a -80°C.

Para a realização das técnicas de coloração por Hematoxilina-eosina e imunohistoquímica em lâminas, a amostra foi processada nas seguintes etapas:

- 1) A amostra de fígado foi fixada em solução de formalina a 10% em solução salina tamponada, durante 24 horas.
- 2) Após a lavagem em solução salina tamponada, a amostra foi submetida a desidratação em gradiente de etanol (do etanol 30% ao etanol Absoluto) durante 1 hora.
- 3) A seguir, o processo de diafanização, em quatro banhos sucessivos em xilol, durante 1 hora.
- 4) A etapa de impregnação foi feita em dois banhos sucessivos de uma hora cada de parafina liquefeita (56-58°C).
- 5) Após a impregnação, o molde do bloco de parafina é confeccionado com a amostra processada.

Os blocos foram cortados em micrótomo rotativo (Mícron HM325, Alemanha), sendo obtidos cortes de três micrometros (3 μ m). Cada corte foi colocado em lâminas para microscopia e mantidas em estufa a 58 °C durante 6 horas para

completa fixação dos cortes. Estas lâminas foram submetidas á coloração de Hematoxilina-eosina e aos procedimentos imunohistoquímicos.

4.4.6 Produto de Aborto

O produto de aborto colhido durante a cirurgia, totalmente livre de outros tecidos, foi processado para a realização de RT-PCR. A amostra foi lavada duas vezes em solução salina tamponada pH 7,5. Após a lavagem, o produto de aborto foi picado em pedaços aproximados (0,3x0,3)cm e lavados duas vezes em solução salina tamponada. Após a lavagem foi adicionado 800 µL RNAzol™ (Invitrogen, EUA) e armazenado a -80 °C.

4.5 Sorologia

As sorologias para pesquisa de IgG e IgM específicas para o vírus da rubéola, foi realizada utilizando-se o kit de ELISA (marca Behring Marburg GmbH-Germany). Os pacientes com suspeita de reinfecção foram confirmados utilizando a técnica de avidéz de anticorpos IgG para o vírus da rubéola, marca Enzywell Dieese, (Diagnóstica Senese, Italy). Índices iguais ou inferiores a 30%, foram considerados de baixa avidéz e acima destes valores, alta avidéz (HEDMAN et al. 1993; THOMAS et al. 1991).

No caso nº 3, com insuficiência hepática aguda foram realizadas pesquisa de IgG e IgM específicas, utilizando-se o kit de ELISA para sarampo (marca Behring Marburg GmbH-Germany), citomegalovirus (marca Behring Marburg GmbH-Germany), vírus Epstein-Barr (Biomerieux, France), parvovirus B19 (Biotrin™ Internacional, Dublin, Irlanda). O diagnóstico para herpes vírus tipo 6 foi realizado utilizando-se Reação de Imunofluorescência Direta (Biotrin™, Internacional, Dublin, Irlanda). As sorologia para os vírus hepatite A, B, C e E foram realizadas no Instituto de Infectologia Emilio Ribas. No caso nº4 com suspeita de encefalite, foram realizadas sorologias para herpes tipo 1, citomegalovirus, varicela e sarampo (marca Behring Marburg GmbH-Germany).

4.6 Isolamento Viral

Células Vero (rim de macaco verde africano-ATCC CCL 81) e SIRC (córnea de coelho-ATCC CCL 60), foram cultivadas em garrafas de plástico para cultura de células de 25 cm² de diâmetro, na concentração de 1x10⁶ células/mL em meio DMEM/RPMI (vol/vol) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado, gentamicina 100 µg/mL, 200 mL L-glutamina. As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ em estufa automática. O crescimento celular foi acompanhado por observação diária em microscópio invertido. Após a formação da monocamada, as células foram inoculadas com as amostras e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado meio de cultura (DMEM/RPMI) contendo 2% de soro fetal bovino e gentamicina 40mg/mL. As culturas celulares inoculadas foram incubadas durante 8 dias a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ em estufa automática marca Forma Scientific. As culturas foram examinadas diariamente, com o auxílio do microscópio óptico invertido marca Zeiss para avaliação do efeito citopático. Após este período, a suspensão celular foi obtida por raspagem com bastão de plástico, seguida de três lavagens em meio DMEM sem soro. O sedimento final foi suspenso em RNasol para o processamento de identificação do vírus por RT-PCR.

4.7 Microscopia Óptica

4.7.1 Coloração com Azul de Toluidina

Monocamadas de culturas de células confluentes inoculadas e não inoculadas foram coradas pelo corante azul de toluidina. Antes da fixação, o meio de cultura foi cuidadosamente retirado e as células foram fixadas em 1.0% de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio e potássio 0,15 M, pH 7,2. A fixação ocorreu por dez minutos, à temperatura ambiente. A seguir, as células foram lavadas em uma solução de lavagem contendo tampão fosfato e potássio 0,15M, pH 7,2 durante 15 minutos e corados durante 10 minutos numa solução aquosa de

azul de toluidina 1%, pH 3,5. As culturas foram lavadas em solução de lavagem e rapidamente observadas e fotografadas em microscópio óptico Olympus.

4.7.2 Coloração com Hematoxilina-eosina

As lâminas, com os cortes histológicos, selecionadas para esta coloração foram submetidas ao seguinte procedimento (Stevens; Wilson, 1996):

- 1) desparafinização, por meio de imersão das lâminas, em dois banhos sucessivos de uma hora cada, em xilol;
- 2) retirada do solvente (xilol) em três banhos sucessivos de álcool absoluto;
- 3) re-hidratação dos cortes em banhos de álcoois hidratados 95% e 80%;
- 4) re-hidratação completa em água corrente e enxágüe em água destilada;
- 5) imersão em solução corante hematoxilina de Harris (Harris, 1900) por um minuto;
- 6) lavagem em água corrente e destilada;
- 7) desidratação parcial em banhos de álcool a 50%, 80% e 95%;
- 8) imersão em solução corante eosina amarelada a 0,5% (em álcool a 95%) por 30 segundos;
- 9) enxágüe em banhos de álcool a 95% e absoluto para desidratação dos cortes;
- 10) diafanização em quatro banhos sucessivos de xilol;
- 11) montagem das lâminas com lamínula de vidro e resina sintética Entellan (Merck, Alemanha) para realização do exame microscópico.

4.7.3 Imunohistoquímica

As lâminas, com os cortes histológicos, selecionadas para esta metodologia, foram submetidas aos procedimentos 1 a 4 descritos acima.

A fixação do tecido em formalina, mais comumente empregada na rotina histológica, apesar de preservar satisfatoriamente a morfologia das células, dificulta o acesso dos anticorpos aos epítomos no decorrer da reação imunohistoquímica. Para contornar esta situação, as lâminas foram submetidas a processo de recuperação antigênica, por calor úmido e sob pressão (Norton, 1994; Miller, 1995), antes da incubação com a solução de anticorpos.

- 1) após re-hidratação completa dos cortes, as lâminas foram introduzidas em solução de ácido cítrico 10 mM, pH 6,0 e submetidas a aquecimento a alta temperatura em panela de pressão comum (doméstica) por três minutos sob pressão;
- 2) a panela foi rapidamente resfriada sob água corrente e as lâminas lavadas exaustivamente em água corrente e enxaguadas em água destilada;
- 3) imersão das lâminas em solução salina tamponada com fosfatos (PBS 10 mM / pH 7,4) por 10 minutos a temperatura ambiente;
- 4) pré-incubação dos cortes com solução de soro normal de bode a 5% em PBS, por 30 minutos em câmara úmida a 37 °C;
- 5) retirada do soro normal de bode e incubação, por 12 horas em câmara úmida a 4°C, com anticorpo monoclonal específico para glicoproteína E1 e proteína de capsídeo (C), gentilmente cedidos por Dr. J. Icenogle (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta-USA), diluídos, respectivamente, a 1:1000 e 1:200, em solução de Albumina bovina a 1% em PBS;
- 6) lavagens, para retirada do excesso de anticorpos que não reagiram, em três banhos de PBS de 5 minutos cada, a temperatura ambiente.
- 7) incubação com solução de polímeros de dextran conjugados com anti-imunoglobulinas de camundongo e enzima fosfatase alcalina (Sabattini, 1998) (kit Envision[®], Dako Cytomation, E.E.U.U.), por 30 minutos em câmara úmida a 37° C;
- 8) lavagens, para retirada do excesso de conjugado que não reagiu, em três banhos de PBS de 5 minutos cada, a temperatura ambiente.
- 9) revelação da reação com substrato cromogênico naftol-ASMX-fosfato e Fast Red TR (kit Permanent Red Substrate-Chromogen, Dako Cytomation, E.E.U.U.), por 5 minutos em câmara úmida a 37 °C;
- 10) lavagem, para retirada do excesso de solução que não reagiu, em água corrente e enxágüe em água destilada;
- 11) contra-coloração leve com hematoxilina de Harris, lavagem em água corrente para retirada do excesso de corante e enxágüe em água destilada.
- 12) pré-montagem com resina de base aquosa cristal mount (Biomed, E.E.U.U.) e montagem definitiva com lamínula e resina sintética entellan (Merck, Alemanha).

4.7.4 Microscopia Eletrônica

A morfologia do vírus da rubéola foi observada pela técnica de coloração negativa (ALAIN et al., 1987). A adesão, das partículas virais, foi efetuada em grades de cobre de 300 mesh (unidade de medida da malha) recobertas com formivar e carvão. A grade foi colocada em contato com 0,03 mL da amostra. Após 30 minutos, o excesso de amostra foi retirado da grade com papel de filtro e corado por 5 minutos, com fosfotungstato de potássio a 2% pH 6,4. Após a coloração, a grade foi examinada em microscópio eletrônico .

4.8 Extração do RNA total

Ao material biológico: linfócito, urina, líquido cefalorraquidiano, explante de fígado, produto de abortamento, cultura de células inoculadas e não inoculadas, após o tratamento com 800 μ L RNazol™ (Invitrogen, EUA) foi adicionado a 200 μ L de clorofórmio isoamil (Sigma, EUA), incubado em banho de gelo durante 5 minutos e microcentrifugado a 3.220g por 20 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, 500 μ L do sobrenadante, foram removidos e transferidos para outro tubo de polipropileno, ao qual adicionou-se 500 μ L de isopropanol. Após agitação (vortex) a amostra foi mantida em banho de gelo por 20 minutos e microcentrifugada a 3.220g por 15 minutos. O sedimento foi lavado com 1000 μ L de etanol 75% e microcentrifugado a 1.260 g por 8 minutos a 4 °C. O sedimento foi seco por 2 minutos a 94 °C e ressuspenso em 20 μ L de água Milli-Q.

4.9 Diagnóstico por RT-PCR

A reação de amplificação para o diagnóstico do vírus da rubéola, foi preconizada por Bosma et al.(1995a). Primers (Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) complementares, a glicoproteína E1 do vírus da rubéola, foram utilizados. A localização de cada primer do genoma viral, polaridade e sequências 5' $\rightarrow$ 3' estão representados na Figura 8 e Tabela 3 (BOSMA et al., 1995a). Os primers R2 e R7 foram utilizados na reação de PCR e os primers R11 e R8c foram utilizados para o *nested*-PCR.

Figura 8. Esquema de amplificação do genoma da glicoproteína E1 do vírus da da rubéola a partir do fragmento gerado pelos primers R2 combinado com o primer R7 produzindo um fragmento de 185pb. A segunda amplificação (nested-PCR), foi realizada com os primers R11 e R8c que amplificam um fragmento interno ao já amplificado, com 146pb.

Tabela 3- Sequências dos primers utilizados na PCR para diagnóstico da infecção pelo vírus da rubéola.

Primer	Sequência 5'—3'		Posição no Genoma
R2 (S)	CAA.CAC.GCC.GCA.CGG.ACA.AC	PCR	8807-8286
R7 (A)	CCA.CAA.GCC.GCG.AGC.AGT.CA	PCR	8991-8972
R11(S)	CTC.GAG.GTC.CAG.GTC.CYG.CC	n-PCR	8826-8845
R8C(A)	GAA.TGG.CGT.TGG.CAA.ACC.GG	n-PCR	8968-8949

(Bosma et al., 1995)

4.9.1 Reação de Transcrição Reversa (RT)

Para a reação de RT foram adicionados, para cada 5 μ L da amostra do produto extraído, 10 mM de Tris-HCL (pH 8,3), 50 mM de KCl, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM de cada dNTP (desoxinucleotideo trifosfato), 1,0U inibidor de RNase, 3,85 mM do primer R7, 2.5 U de transcriptase reversa, M-MLV (Moloney murine leukemia vírus reverse transcriptase) e água Milli-Q para completar um volume final de 20 μ L. Essa mistura foi incubada a 37 °C por 10 minutos, 42 °C por 30 minutos, 99 °C por 7 minutos, 4 °C por 2 minutos e a seguir foi utilizada na reação de PCR.

4.9.2 Reação da Polimerase em cadeia (PCR)

A amplificação foi realizada adicionando-se 10 μ L do produto da RT a uma mistura contendo uma concentração final de 10 mM Tris-HCL (pH 8,3), 50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP (desoxinucleotideo trifosfato), 0,77 μ M do primer R2 e R7, 2,5 U da Taq Polymerase (Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e água Milli-Q livre de Dnase e Rnase para completar o volume final de 80 μ L. As amostras foram submetidas a repetidos ciclos de variação de temperatura em termociclador (Eppendorf MasterCycler® Gradiente, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) os quais consistiram de um etapa de denaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, 30 ciclos caracterizados por 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos (anelamento dos primers) e 72 °C por 1 minuto (extensão) e 72 °C por 5 minutos para finalização. A adição do produto amplificado foi realizado em um ambiente separado da sala de PCR tomando todos os cuidados para evitar a contaminação.

4.9.3 Reação de nested-PCR

A *nested*-PCR, foi feita com 1 μ L do produto do PCR com Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP (desoxinucleotideo trifosfato), 0,77 μ M do primer R11 e R8C, 2,5 U da Taq Polymerase (Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e água Milli-Q livre de Dnase e Rnase

para completar o volume final de 100 μ L. As amostras foram submetidas às mesmas temperaturas aplicadas à primeira reação de amplificação (PCR), usando somente 25 ciclos. A nested PCR seguiu os cuidados descritos no item 4.8.3.

4.9.4 Detecção do Produto Amplificado

Um volume de 10 μ L do produto final da PCR e *nested*-PCR foram adicionados a 4 μ L do tampão 10x Bluejuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Esta mistura foi aplicada em gel de agarose 2% preparado com tampão TBE 1x e 0.5 μ g/mL de brometo de etídio. Ao gel também foi aplicado um marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para avaliação do tamanho do fragmento obtido. O gel foi submetido a uma voltagem de 100 V por 1 hora e o produto amplificado foi visualizado em um transiluminador de luz ultra violeta acoplado a um sistema de captura de imagem (Image Acquisition and Analysis Software, UVP, INC, CA, EUA) e fotografado com máquina Polaroid (Modelo MP-4 Lana Câmera, Polaroid do Brasil Ltda) e filme (Polaroid 667) exposto através de filtro laranja de 75 mmx75 mm (Kodak, Wratten Gelatin Filter, Eastamm Kodak Company).

4.10 Sequenciamento da Glicoproteína E1

A região amplificada foi o fragmento do gene da glicoproteína E1 (nt 8731-9469) preconizado pela Organização Mundial da Saúde. As amostras foram nomeadas segundo os critérios propostos pela Organização Mundial da Saúde com as seguintes designações: Rvi: vírus da rubéola isolado de cultura de células, Rvs: para o RNA extraído direto da amostra clínica; seguido da cidade, do número da amostra, país onde foi isolado, ano, SRC se for caso de Síndrome da Rubéola Congênita e ICR para infecção congênita por rubéola (WHO, 2005).

4.10.1 Reação de Transcrição Reversa (RT)

O cDNA foi obtido em duas etapas: Pré-RT e RT. A reação de pré-RT foi realizada adicionando-se para cada 6 μ L do produto extraído, 1 μ L de Oligo dT (Oligo dT₁₂₋₁₈ Primer 0.5 μ g/mL - Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e 5 μ L de água Milli-Q obtendo um volume final de 12 μ L. Essa mistura foi incubada a 95 °C por 3 minutos e a 25 °C por 25 minutos. Ao produto de reação de pré-RT foram adicionados 4 μ L de 10 mM de Tris-HCL (pH 8,3), 50 mM de KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM de cada dNTP (desoxinucleotideo trifosfato), 1,0 U inibidor de RNase, 0,5 μ L de 5 U/ μ L transcriptase reversa (SuperScript™ II One-Step), 1 μ L RNase OUT (Rnsase OUT™ Ribonuclease Inhibitor-Recombinant 40 U/ μ L). Essa mistura foi incubada a 42 °C por 60 minutos e a 95 °C por 5 minutos.

4.10.2 Descrição dos Oligonucleotídeos (Primers)

A detecção do ácido nucleico viral pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras dos pacientes e culturas inoculadas foi realizada utilizando os primers descritos por Frey et al. 1993, para amplificação do vírus da rubéola. Os primers (Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) complementares a glicoproteína E1 do vírus da rubéola, foram utilizados para amplificar e sequenciar as amostras do vírus da rubéola. O produto foi amplificado com *primers* R66 combinado com o primer R65 produzindo um fragmento com 640 pares de base (Pb), o primer R85 combinado com o primer R9 produzindo um fragmento com 602 pares de base (Pb). Logo após procedeu-se a uma segunda amplificação (nested-PCR), utilizando *primers* (R85 e R72) que amplificam um fragmento interno ao já amplificado, com 519 Pb. (Figura 9). A localização de cada primer do genoma viral, polaridade e sequências 5' a 3' estão representados na Tabela 4 (Frey et al. 1993).

Figura 9. Esquema de amplificação do genoma da glicoproteína E1 do vírus da rubéola a partir do fragmento gerado pelos primers R66 combinado com o primer R65 produzindo um fragmento de 640pb, o primer R85 combinado com o primer R9 produzindo um fragmento de 602pb. A segunda amplificação (nested-PCR), foi realizada com os primers S(R85 e R72) que amplificam um fragmento interno ao já amplificado com 519 pb. As variações nucleotídicas da glicoproteína E1: 8768, 8879, 8880, 8996, 9380. pb: pares de base

Tabela 4 Primers utilizados na PCR para seqüenciamento da glicoproteína E1 do vírus da rubéola

Primer	Sequência 5'—3'	PCR	Posição no Genoma
R66(S)	CCA.GCA.CCC.TCA.CAA.GA	PCR/SEQ	8696-8712
R65(A)	GCT.GGT.GGA.AGG.CCT.TG	PCR/SEQ	9320-9336
R85(S)	TCG.AAA.TGC.CCG.AGT.GG	PCR/SEQ	9154-9170
R9(A)	TAT.ACA.GCA.ACA.GGT.GCG.GGA.ATC	PCR/SEQ	9727-9756
R85(S)	TCG.AAA.TGC.CCG.AGT.GG	n-PCR/SEQ	9154-9170
R72(A)	AAT.GTA.GTA.CAA.GCA.TTT.GGC.ACA	n-PCR/SEQ	9649-9673

(Frey e Albernathy, 1993).

4.10.3 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

A amplificação foi realizada adicionando-se a 5 µL do produto da RT, uma mistura contendo uma concentração final de 10mM Tris-HCL (pH 8,3), 50mM KCl) 10 x concentrado; 3mM MgCl₂; 200 µM de cada dNTP (desoxinucleotideo trifosfato); 10 pmol de cada primer, 2,5U da Taq Polymerase (Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e água Milli-Q livre de Dnase e Rnase para completar o volume final de 50 µL. As amostras foram submetidas a repetidos ciclos de variação de temperatura em termociclador (Eppendorf MasterCycler Gradient, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) os quais consistiram de um etapa de denaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto (denaturação); 55 °C por 1 minuto (anelamento dos primers) e 72 °C por 1 minuto (extensão), e um aquecimento a 72°C por 7 minutos para extensão final.

4.10.4 Reação de *nested* PCR

Para a segunda amplificação, foram adicionados à 5 μ L do produto da PCR, 10 μ L de tampão de reação (20mM de Tris-HCl (pH 8,8), 10mM de KCl) 10x concentrado; 2mM $MgCl_2$, 0,2mM de cada dNTPs; 10 pmol de cada primers (66/85; 66/65), 2.5 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e água Milli-Q livre de DNase e RNase para completar o volume final de 50 μ L. As amostras foram submetidas ao mesmo ciclo de variação de temperatura da reação da PCR.

4.10.5 Purificação do DNA para Reação de Sequenciamento

O DNA extraído, após eletroforese em gel de agarose, foi purificado com o kit Gel Extraction System (Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA)) conforme instruções do fabricante. O produto de purificação foi aplicado em gel de agarose 2% preparado com Tampão TBE 1X contendo 0.25 μ L de brometo de etídeo. Também foi aplicado ao gel, 4 μ L de um padrão de massa molecular (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), O gel foi submetido a procedimentos semelhantes ao item 4.8.4 (Detecção do Produto Amplificado). A concentração de DNA presente na amostra foi determinada por comparação de intensidade das bandas das amostras com a banda do padrão, conforme instruções do fabricante.

4.10.6 Reação de Seqüenciamento (*Cycle Sequencing*)

Após a purificação, as fitas de DNA foram seqüenciadas utilizando-se o kit *ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction* (Applied Biosystem). O DNA obtido após a purificação, foi utilizado para reação de seqüenciamento com um volume final de 10 μ L, como segue: 5 μ L de DNA correspondendo de 10 a 30 ng do produto purificado foram adicionados a um microtubo contendo 3,2pmol de *primer*, 2 μ L de *BigDye™ Terminator cycle sequencing reaction* (Applied Biosystems), 2 μ L de tampão de seqüenciamento (*save money-* Tris HCl 200mM [pH 9,0] e 5mM $MgCl_2$) e água Milli-Q® para

completar um volume final de 10 μ L. Todas as reações foram feitas em triplicatas, sendo uma das reações de seqüenciamento com *primer forward* e duas para o *reverse*. Após homogenização, a mistura foi levada ao termociclador (Eppendorf, modelo mastercycler[®] ep, Alemanha), onde foi aplicado o seguinte programa de amplificação: 96 °C a 20 segundos, 50 °C a 15 segundos e 60 °C a 4 minutos extensão da nova fita de DNA.

4.10.7 Purificação do DNA após Reação do Sequenciamento

O produto amplificado foi purificado adicionando-se 50 μ L de etanol absoluto (Merck, SP) com 2 μ L de acetato de sódio, com posterior agitação (vórtex) por 15 segundos e incubação à -20 °C durante 24 horas. Após este período, o produto amplificado foi centrifugado a 15.800g (Eppendorf[®], Alemanha) por 30 minutos à temperatura ambiente. Todo o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado, adicionando-se 150 μ L de etanol 70%, seguido de agitação (vórtex) por 15 segundos e centrifugação (15.800g x) por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante, e após inversão do microtubo em papel de filtro; os microtubos foram secos em uma centrifuga tipo *speed vacuum* (Eppendorf[®], Alemanha) por 20 minutos à temperatura de 60 °C.

As amostras secas foram ressolubilizadas em 10 μ L de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, USA) e submetidas a vigorosa agitação (vórtex) por 30 segundos. Subsequentemente as amostras foram colocadas em uma microplaca, sendo a seguir desnaturadas a 95 °C durante 5 minutos e aplicadas em um seqüenciador automático (16 capilares), modelo ABI-3100 (Applied Biosystems[®], Inc., Foster, City, CA, USA). Foram utilizados parâmetros padronizados para injeção e a separação eletroforética foi realizada com o uso do polímero POP6.

4.10.8 Edição e Alinhamento das Sequências do Gene E1 do Vírus da Rubéola

As seqüências de nucleotídeos foram analisadas com o programa *Sequence Navigator* versão 1.0 (Applied Biosystems Inc., EUA) para *Power Macintosh* e alinhadas no programa *Clustal W*, versão 1.4 (THOMPSON et al., 1994). Posteriormente, estas seqüências foram traduzidas utilizando o programa *Edit Seq*[™] 4,05 – *Expert Analysis Software* – DNASTAR, Inc. para PC. As

sequencias de nucleotídeos correspondente à região E1, foram alinhadas utilizando o programa Meg Alin™ 4.05 – *Expert Analysis Software* – DNASTAR, Inc., EUA. Ambos foram analisados, concomitantemente, com o referido programa, tendo como resultado a obtenção do grau de similaridade entre as sequências, calculadas par a par, o que possibilitou a identificação das sequências de nucleotídeos idênticas.

As sequencias obtidas também foram alinhadas com sequencias de rubéola obtidas no GenBank pelo método Clustal W para posteriormente uso na análise filogenética.

4.10.9 Análise Filogenética

A árvore filogenética para caracterização dos genótipos, foi construída utilizando o programa MEGA versão 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (KUMAR et al., 2001). As 29 novas sequências obtidas e as amostras de rubéola publicadas no GenBank e classificadas dentro dos genótipos publicados (WHO, 2005) (Tabela 5) foram alinhadas pelo método Clustal W conforme descrito no item 4.10.8 para obtenção da topologia da árvore. Também foi empregado o programa PAUP*4.0 versão Beta-Sinauer Associates, Inc, (SWOFFORD, 1998) para Power Macintosh e Unix onde foram calculados os valores de *bootstrap*, com 100 réplicas, para a verificação da sustentação de ramos nas topologias da árvores obtidas.

Tabela 5- Representação das linhagens de referência dos genótipos do vírus da rubéola, baseado no ano do isolamento, país e número de acesso no GenBank”.

Países	Linhagen de Referência	Genotipo	Ano	n°acesso no GenBank
Bélgica	Rvi/BEL/63	1a	1963	AF188704
Brazil	RVs/Rio de Janeiro.BRA/97	1B	1997	AJ980442
	RVs/Rio de Janeiro.BRA/99	1G	1999	AJ980443
China	Rvi/Shandong.CHN/02	1E	2002	AY968210
	RVI/Anhui.CHN/00	1F	2000	AY968215
	Rvi/Shandong.CHN/00	1F	2000	AY968213
	Rvi/Beijing.CH/79	2A	1979	AY258322
	Rvi/Beijing.CH/80	2A	1980	AY58323
Israel	Rvi/ISR/88	1B	1988	AY968209
	RVi/TelAvivi.ISR/68	2B	1968	AY968219
Japão	Rvi/Akita.JPN/90	1C	1990	ABO003354
	RVI/SAITAMA.JPN/94	1D	1994	AY968216
	Rvi/Toyo.JPN/90CRS	1D	1990	AY968214
	Rvi/Tokyo.JPNH/90(CRS)	1D	1990	AY968214
Russia	Rvi/C4.Rus/67	2C	1967	DQ388279
	Rvi/MOscow.RUS/97	2C	1997	AY247019
USA	Rvi/LosAngeles.Cal.USA/91	1C	1991	AY968212
	Rvi/Fla.USA/21.97	1E	1997	AY326356
	Rvi/Seatle.Wah.USA/16.00	2B	1968	AY968219

5 RESULTADOS

5.1 Quadro Clínico

No período de 1997 a dezembro de 2004, foram incluídos 29 casos de pacientes com suspeita de infecção pelo vírus da rubéola. Dentre estes pacientes, 28 foram analisados por sorologia, isolamento viral e PCR (Tabela 1), sendo 11 (38%) do sexo masculino e 17 (58,6%) do sexo feminino. No caso de nº 25 de ICR, o produto de aborto foi analisado por RT-PCR. A maioria dos casos, em todas as faixas etárias, não eram vacinados ou ignoravam seu passado vacinal. Quatorze dos casos estudados foram procedentes da epidemia da rubéola que ocorreu no Estado de São Paulo no ano de 2000 (Tabela 2).

Os casos nº 2 e 24 relacionados a SRC, as mães dos recém-nascidos, não apresentaram quadro clínico com exantema e febre em idade gestacional, porém seus recém-nascidos apresentaram alterações pós nascimento: 1 apresentou retinopatia pigmentar e 1 apresentou malformação cardíaca. O caso nº 25 de ICR, a paciente (mãe) apresentou exantema e febre na 10ª semana de gestação e devido a intensa infecção viral, abortou na 12ª semana de gestação. Os casos nº 03 e 04 apresentaram quadro clínicos graves associados ao vírus da rubéola: insuficiência hepática aguda e encefalite. O paciente com quadro de insuficiência hepática aguda (caso nº 3), necessitou de um transplante de fígado 25 dias após o início dos sintomas. O paciente iniciou quadro de febre, dor abdominal, diarreia, vômitos e, posteriormente, icterícia, urina escura e fezes cor de argila foram notados. Não havia história de erupção cutânea. O agravamento da sua situação clínica e o diagnóstico de encefalopatia grau II levou à sua transferência para um serviço de transplante hepático pediátrico. O paciente não apresentava história prévia de infecções graves, oportunistas ou repetidas. O caso nº 4 foi hospitalizado com febre, náusea, cefaléia intensa e confusão mental. Oito dias antes dos sintomas acima descritos, o paciente teve exantema e febre e após visita ao médico da família, foi diagnosticado como escarlatina, não sendo realizado a sorologia para sarampo ou rubéola. Durante a hospitalização, teve convulsão, porém não apresentou sinais de irritação na meninge e o seu eletroencefalograma mostrou atividade lenta, mas sem atividade elíptogenica.

5.2 Sorologia

Entre os pacientes estudados, 24 apresentaram resultado de soro diagnóstico reagente para IgM específica para o vírus da rubéola (Tabela 5). Quatro pacientes com suspeita de reinfecção (casos no. 20, 25, 26 e 27) foram não reagentes. As amostras destes pacientes foram processadas para o teste de avidéz e todos apresentaram alta avidéz (80-90%).

No paciente com insuficiência hepática aguda (caso nº3), foram realizadas sorologias para hepatite A, B e C; citomegalovírus, parvovirus B19, herpes 6 e sarampo, todas negativas e sorologia positiva (IgM e IgG) para rubéola. No paciente com encefalite (caso nº4) foram realiza das sorologias em amostras de soro e liquor, para detecção de anticorpos para herpes virus tipo 1, varicela, citomegalovírus e sarampo, no líquido cefalorraquidiano e soro, com resultados negativos. A análise sorológica do líquido cefalorraquidiano do caso com suspeita de encefalite apresentou anticorpos IgM e IgG positivos para o vírus da rubéola.

5.3 Comparação das Técnicas de Isolamento Viral e RT-PCR para o Diagnóstico do Virus da Rubéola

A RT-PCR da amostra direta, foi positiva em 25/31 (80%) amostras analisadas. Após a amplificação obtivemos um fragmento de 185 pb na PCR e 145 pB na nested-PCR, sendo 15 amostras positivas pela PCR e 10 por nested-PCR. Das trinta amostras inoculadas em cultura de células, todas foram positivas por RT-PCR (Tabela 5), sendo 25 amostras positivas pela PCR e 5 positivas por nested-PCR.

Figura 10. A- Eletroforese em gel de agarose. A- 1-PM (marcador de peso molecular); 2- Produto da PCR de 185pb gerados com os primers R7 e R2. 3- Controle - negativo. B- 1-PM; 2- produto da nested-PCR de 143 pb gerados com os primers R11 e R8c; 3- Controle Negativo.

Tabela 6- Resultado das Sorologias, RT-PCR da Amostra Direta, Isolamento Viral e RT-PCR das Culturas Inoculadas

Paciente caso n.º	Amostra	Intervalo entre clínica/coleta	Sorologia	Amostra Direta RT-PCR	Cultura de Células Isolamento Vir al	RT-PCR
1	urina	1D	POS	NEG	POS	POS
2	sangue	4D	POS	POS	POS	POS
3	sangue	25D	POS	POS	POS	POS
	explante figado	25D		POS	não realizado	não realizado
4	sangue	5D	POS	POS	POS	POS
	LCR	5D	POS	POS	POS	POS
5	sangue	1D	POS	NEG	POS	POS
6	sangue	3D	POS	POS	POS	POS
7	urina	4D	POS	POS	POS	POS
8	sangue	4D	POS	POS	POS	POS
9	urina	1D	POS	NEG	POS	POS
10	sangue	5D	POS	POS	POS	POS
11	sangue	4D	POS	POS	POS	POS
12	urina	2D	POS	POS	POS	POS
13	sangue	4D	POS	POS	POS	POS
14	sangue	1D	POS	POS	POS	POS
15	urina	3D	POS	POS	POS	POS
16	sangue	7D	POS	POS	POS	POS
17	urina	1D	POS	NEG	POS	POS
18	sangue	2D	POS	POS	POS	POS
19	sangue	3D	POS	POS	POS	POS
20	sangue	1D	NEG	POS	POS	POS
21	sangue	4D	POS	POS	POS	POS
22	sangue	3D	POS	POS	POS	POS
23	sangue	1D	POS	NEG	POS	POS
24	sangue	1D	POS	NEG	POS	POS
25	produto aborto	35D	não realizado	POS	POS	POS
26	swab de orofaringe	3D	POS	POS	POS	POS
27	urina	1D	NEG	POS	POS	POS
28	urina	1D	NEG	POS	POS	POS
29	urina	4D	NEG	POS	POS	POS

D- DIAS

POS-Positivo

NEG-Negativo

5.4 Isolamento Viral em Cultura de Células

Trinta amostras (18 amostras de sangue, 9 amostras de urina, 1 swab da orofaringe, 1 liquor cefalorraquidiano e 1 produto de aborto) inoculadas nas linhagens celulares Vero e SIRC foram observadas diariamente para visualização do efeito citopático (ECP). O ECP foi observado em 15 amostras inoculadas na primeira passagem, em 12 amostras após a segunda passagem e em três somente após terceira passagem. Desta forma, a utilização de duas passagens elevou a taxa de positividade nos isolamentos em 34%. Em relação às linhagens celulares empregadas, observou-se que a linhagem celular SIRC apresentou melhor crescimento celular e melhor visualização do ECP quando comparada com as células Vero. Após 72 horas, tanto nas células Vero como na SIRC, observou-se focos de células arredondadas, vacuolização do citoplasma e contração do núcleo celular (Figura 11). foi também observada através da microscopia eletrônica, a estrutura do vírus da rubéola, do caso nº27, (Figura 12).

Figura 11. A- Fotomicrografias de células Vero não infectadas; B- Cultura de células Vero inoculadas com amostra do caso nº 27 incubadas durante 7 dias. C- Cultura de células SIRC não infectadas; D- Cultura de células SIRC inoculadas com amostras do caso nº 27 incubadas durante 7 dias. Ambas as células (Vero e SIRC) inoculadas apresentam expansão do citoplasma, arredondamento celular e contração do núcleo celular

Figura 12. Fotomicrografia eletrônica do vírus da rubéola, isolado em cultura de células SIRC inoculadas com amostra do caso nº27. Coloração negativa. Aumento 75.000X. Fotografia cedida pela Seção de Microscopia Eletrônica, do Instituto Adolfo Lutz.

5.5 Coloração de Hematoxilina-eosina e Imunohistoquímica

O diagnóstico histológico do explante de fígado do caso n.03 mostrou células gigantes e necrose hepática submassiva. Os hepatócitos gigantes apresentam vários núcleos imersos no citoplasma. Entre a hipertrofia e hiperplasia das células de Kupfer são encontrados vários leucócitos polimorfonucleares e linfócitos. A arquitetura do fígado, apesar das extensas lesões continuam normais, com espaço portal preservado com escassas células inflamatórias (Figura 13).

Figura 13. Fotomicrografias obtidas do explante de fígado corado com hematoxilina - eosina. A- Notar os hepatócitos gigantes, a presença de necrose confluyente, regeneração e colestase intracanalicular (HE, x100). B-Vários hepatócitos gigantes contendo varios núcleos imersos no citoplasma (HE,x400).C- Células de Kupffer hipertróficas e hiperplásicas onde são encontrados linfócitos e vários leucócitos polimorfonucleares (HE, x200). D- Notar que a arquitetura do fígado continua normal, os intervalos portais estão preservados com a presença de escassas células inflamatórias (HE x 40). E e F- Apesar da reação ductular, não apresenta hepatite de interface (HE x100, HE x200;).

G, H, I. Fotomicrografias da detecção imunohistoquímica do antígeno do vírus da rubéola em parafina fixadas em formalina, mostrando o antígeno E1 do vírus da rubéola corado em vermelho cereja e os núcleos em azul nos hepatócitos e células Kupffer (G, H, x40, x200); I- células endoteliais e células de Kupffer positivas para o antígeno E1(x400).

5.6 Amplificação e Filogenia da região E1 do genoma do vírus da rubéola

Foram amplificadas da região E1 do genoma do vírus da rubéola trinta e uma amostras para caracterização molecular, entretanto, foram incluídas para a realização da árvore filogenética, 29 amostras, pois os casos que possuíam duas amostras (casos nº 3, 4) somente uma de cada caso foi incluída para a realização da árvore filogenética. As sequências geradas neste estudo, quando alinhadas com sequências representativas dos diferentes genótipos do vírus da rubéola obtidas no GenBank resultou em uma árvore filogenética, que agrupou 19 amostras brasileiras no genótipo 1a e dez ao grupo do genótipo 1G demonstrada na Figura 14. O genótipo 1a encontrado circulando em quase todos os anos (Gráfico 7). No grupo das sequências do genótipo 1a estão as sequências obtidas dos casos de hepatite fulminante, encefalite, reinfecções, SRC e casos da epidemia de 2000. A similaridade entre as seqüências de nucleotídeos das amostras intra-grupo do genótipo 1a variou de de 96,8% a 99,8% respectivamente (Figura 15 e 16). Quando as seqüências nucleotídicas das amostras do genótipo 1a são comparadas com os outros genótipos temos resultados mostrados na Figura 15. A similaridade nucleotídica entre os genótipos 1a isolados com o genótipo 1a padrão (CEN) a maior similaridade foi de 98,3%. 99,8%. O genótipo 1G foi encontrado circulando apenas nos anos de 2000, 2002 e 2003 (Gráfico 7). A similaridade intragrupo entre as sequências 1G amplificadas das amostras de pacientes de São Paulo variou de 97.3% a 100% e em relação a sequência padrão 1G (RJBRA/99) variou de 98,8% 97.5% (Figura 16).

Figura 14. Arvore Filogenética das seqüências da glicoproteína E1 do vírus da rubéola isolados no Estado de São Paulo, comparadas com as sequencias de referência do vírus do rubéola depositadas no GenBank (Tabela 5).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29		
1		98.5	98.5	98.5	98.8	98.5	98.3	97.8	98.0	98.8	98.0	98.5	98.5	98.3	97.8	97.8	97.0	96.5	96.5	98.5	94.3	96.0	95.3	95.3	96.3	95.5	92.8	92.3	94.3	1	RVISP01BRA97
2	1.5		99.0	99.0	99.3	99.0	99.3	98.8	99.0	99.3	98.5	99.0	99.0	98.8	98.3	98.3	98.0	97.5	97.5	99.0	95.8	97.0	96.3	95.8	96.8	96.0	94.3	93.3	95.3	2	RVISP01BRA98
3	1.5	1.0		99.0	99.8	99.0	98.8	98.3	98.5	99.3	98.5	99.0	99.0	98.8	98.3	98.3	97.5	97.0	97.0	99.0	95.8	97.0	96.3	96.3	97.3	96.5	93.3	93.8	94.8	3	RVISP01BRA99
4	1.5	1.0	0.0		99.8	99.0	98.8	98.3	98.5	99.3	98.5	99.0	99.0	98.8	98.3	98.3	97.5	97.0	97.0	99.0	95.8	97.0	96.3	96.3	97.3	96.5	93.3	93.8	94.8	4	RVISP02BRA99
5	1.3	0.8	0.3	0.3		99.3	99.0	98.5	98.8	99.5	98.8	99.3	99.3	99.0	98.5	98.5	97.8	97.3	97.3	99.3	95.5	96.8	96.0	96.0	97.0	96.3	93.5	93.5	95.0	5	RVISP03BRA99
6	1.5	1.0	1.0	1.0	0.8		99.3	98.8	99.0	99.3	98.5	99.5	99.0	98.8	98.8	98.8	98.0	97.5	97.5	99.0	95.3	97.0	95.8	95.8	96.8	96.0	93.3	92.8	94.8	6	RVISP02BRA00
7	1.8	0.8	1.3	1.3	1.0	0.8		99.5	99.8	99.5	98.8	99.8	99.3	99.0	98.5	98.5	98.3	97.8	97.8	99.3	95.5	96.8	96.0	95.5	96.5	95.8	93.5	92.5	95.0	7	RVISP03BRA00
8	2.3	1.3	1.8	1.8	1.5	1.3	0.5		99.8	99.0	98.8	99.3	98.8	99.0	98.0	98.0	98.3	97.8	97.8	98.8	95.5	96.8	96.0	95.5	96.5	95.8	93.5	92.5	95.0	8	RVISP06BRA00
9	2.0	1.0	1.5	1.5	1.3	1.0	0.2	0.2		99.3	99.0	99.5	99.0	99.3	98.3	98.3	98.5	98.0	98.0	99.0	95.8	97.0	96.3	95.8	96.8	96.0	93.8	92.8	95.3	9	RVISP07BRA00
10	1.3	0.8	0.8	0.8	0.5	0.8	0.5	1.0	0.8		99.3	99.8	99.8	99.5	98.5	98.5	97.8	97.3	97.3	99.8	95.0	96.8	96.0	96.0	97.0	96.3	93.5	93.0	95.0	10	RVISP08BRA00
11	2.0	1.5	1.5	1.5	1.3	1.5	1.3	1.3	1.0	0.8		99.0	99.5	99.3	97.8	97.8	97.5	97.0	97.0	99.0	95.3	96.5	95.8	95.8	96.8	96.5	93.8	93.3	95.3	11	RVISP11BRA00
12	1.5	1.0	1.0	1.0	0.8	0.5	0.3	0.8	0.5	0.3	1.0		99.5	99.3	98.8	98.8	98.0	97.5	97.5	99.5	95.3	97.0	95.8	95.8	96.8	96.0	93.3	92.8	94.8	12	RVISP12BRA00
13	1.5	1.0	1.0	1.0	0.8	1.0	0.8	1.3	1.0	0.3	0.5	0.5		99.3	98.3	98.3	97.5	97.0	97.0	99.5	95.3	96.5	95.8	95.8	96.8	96.5	93.8	93.3	95.3	13	RVISP13BRA00
14	1.8	1.3	1.3	1.3	1.0	1.3	1.0	1.0	0.8	0.5	0.8	0.8	0.8		98.0	98.0	97.8	97.3	97.3	99.3	95.5	96.8	96.5	96.0	97.0	96.3	93.5	93.0	95.0	14	RVISP14BRA00
15	2.3	1.8	1.8	1.8	1.5	1.3	1.5	2.0	1.8	1.5	2.3	1.3	1.8	2.0		99.5	97.3	96.8	96.8	98.3	95.0	96.8	96.0	95.0	97.0	95.8	93.5	93.5	94.0	15	RVISP01BRA01
16	2.3	1.8	1.8	1.8	1.5	1.3	1.5	2.0	1.8	1.5	2.3	1.3	1.8	2.0	0.5		97.3	96.8	96.8	98.3	95.0	96.8	96.0	95.0	97.0	95.8	93.5	93.5	94.0	16	RVISP02BRA01
17	3.1	2.0	2.5	2.5	2.3	2.0	1.8	1.8	1.5	2.3	2.5	2.0	2.5	2.3	2.8	2.8		99.5	99.5	98.0	94.8	96.0	95.5	95.5	96.0	95.8	93.0	92.0	94.8	17	RVISP01BRA04
18	3.6	2.5	3.1	3.1	2.8	2.5	2.3	2.3	2.0	2.8	3.1	2.5	3.1	2.8	3.3	3.3	0.5		99.5	97.5	94.3	95.5	95.0	95.0	95.5	95.3	92.5	91.5	94.3	18	RVISP02BRA04
19	3.6	2.5	3.1	3.1	2.8	2.5	2.3	2.3	2.0	2.8	3.1	2.5	3.1	2.8	3.3	3.3	0.5	0.5		97.5	94.3	95.5	95.0	95.0	95.5	95.3	92.5	91.5	94.3	19	RVISP03BRA04
20	1.5	1.0	1.0	1.0	0.8	1.0	0.8	1.3	1.0	0.2	1.0	0.5	0.5	0.8	1.8	1.8	2.0	2.5	2.5		94.8	96.5	95.8	95.8	96.8	96.0	93.3	92.8	94.8	20	CEN_1a
21	6.0	4.4	4.4	4.4	4.7	4.9	4.7	4.7	4.4	5.2	4.9	4.9	4.9	4.7	5.2	5.2	5.5	6.0	6.0	5.5		96.0	95.5	94.5	95.0	94.8	91.5	92.0	93.0	21	BR(1G)
22	4.1	3.1	3.1	3.1	3.3	3.1	3.3	3.3	3.1	3.3	3.6	3.1	3.6	3.4	3.3	3.3	4.1	4.7	4.6	3.6	4.1		95.8	96.0	96.8	96.0	93.3	93.3	93.8	22	B32_1B
23	4.9	3.9	3.9	3.9	4.1	4.4	4.1	4.1	3.9	4.1	4.4	4.4	4.4	3.6	4.1	4.1	4.6	5.2	5.2	4.4	4.6	4.4		95.0	96.0	95.3	92.3	92.8	93.0	23	ANI_1C
24	4.9	4.4	3.9	3.9	4.1	4.4	4.7	4.7	4.4	4.1	4.4	4.4	4.4	4.1	5.2	5.2	4.7	5.2	5.2	4.4	5.8	4.1	5.2		96.5	95.8	92.5	92.5	94.0	24	SAI1 JP94_1D
25	3.8	3.3	2.8	2.8	3.1	3.3	3.6	3.6	3.3	3.1	3.3	3.3	3.3	3.1	3.1	3.1	4.1	4.6	4.6	3.3	5.2	3.3	4.1	3.6		97.3	92.5	93.0	93.5	25	CAS_1E
26	4.6	4.1	3.6	3.6	3.9	4.1	4.4	4.4	4.1	3.9	3.6	4.1	3.6	3.9	4.4	4.4	4.4	4.9	4.9	4.1	5.5	4.1	4.9	4.4	2.8		91.8	92.3	93.8	26	AH2_1F
27	7.7	6.0	7.2	7.2	6.9	7.2	6.9	6.9	6.6	6.9	6.6	7.2	6.6	6.9	6.9	6.9	7.4	8.0	8.0	7.2	9.2	7.2	8.3	8.0	8.0	8.9		95.0	95.8	27	BRD1CH79_2A
28	8.2	7.1	6.6	6.6	6.9	7.7	8.0	8.0	7.7	7.4	7.1	7.7	7.1	7.4	6.9	6.9	8.5	9.1	9.1	7.7	8.6	7.2	7.7	8.0	7.4	8.3	5.2		94.8	28	Is 68_2B
29	6.0	4.9	5.5	5.5	5.2	5.5	5.2	5.2	5.0	5.2	4.9	5.5	4.9	5.2	6.3	6.3	5.5	6.0	6.0	5.5	7.4	6.6	7.4	6.3	6.9	6.6	4.4	5.5		29	C74_2C
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29		

Figura 15. Análise de identidade e divergência, pelo método ClustalX, das amostras seqüenciadas na região E1 do vírus da rubéola (401 nt) que pertencem ao genótipo 1a.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1		98.5	99.0	98.8	98.8	98.8	98.8	98.5	99.3	98.8	98.8	96.0	96.8	95.8	95.3	96.3	96.0	91.8	92.3	93.3	1
2	1.5		98.0	99.8	99.3	97.3	97.3	97.0	97.8	97.3	97.8	95.0	96.3	94.8	96.3	95.3	95.0	91.3	91.8	92.3	2
3	1.0	2.0		98.3	98.3	98.3	98.3	98.0	98.8	98.3	97.8	96.0	96.3	95.3	94.8	95.8	95.0	90.8	91.3	92.3	3
4	1.3	0.3	1.8		99.5	97.5	97.5	97.3	98.0	97.5	98.0	95.3	96.5	95.0	96.0	95.5	95.3	91.5	92.0	92.5	4
5	1.3	0.8	1.8	0.5		97.5	97.5	97.8	98.5	98.0	98.5	95.3	96.5	95.5	96.0	95.5	95.3	92.0	92.5	93.0	5
6	1.3	2.8	1.8	2.5	2.5		100.0	98.3	98.5	98.0	97.5	96.3	96.0	95.3	94.5	95.5	95.3	91.5	91.8	93.0	6
7	1.3	2.8	1.8	2.5	2.5	0.0		98.3	98.5	98.0	97.5	96.3	96.0	95.3	94.5	95.5	95.3	91.5	91.8	93.0	7
8	1.5	3.1	2.0	2.8	2.3	1.8	1.8		99.3	99.3	97.8	97.0	97.3	96.3	96.3	96.8	96.5	92.3	92.8	93.8	8
9	0.8	2.3	1.3	2.0	1.5	1.5	1.5	0.8		99.0	98.5	96.3	96.5	96.0	95.5	96.0	95.8	92.0	92.5	93.5	9
10	1.3	2.8	1.8	2.6	2.0	2.0	2.0	0.8	1.0		98.0	96.8	96.5	95.5	95.5	96.0	95.8	92.0	92.5	93.5	10
11	1.3	2.3	2.3	2.0	1.5	2.5	2.5	2.3	1.5	2.0		94.8	96.0	95.5	94.5	95.0	94.8	91.5	92.0	93.0	11
12	4.1	5.2	4.1	4.9	4.9	3.8	3.8	3.1	3.9	3.3	5.5		96.5	95.8	95.8	96.8	96.0	93.3	92.8	94.8	12
13	3.3	3.9	3.8	3.6	3.6	4.1	4.1	2.8	3.6	3.6	4.1	3.6		95.8	96.0	96.8	96.0	93.3	93.3	93.8	13
14	4.4	5.5	4.9	5.2	4.6	4.9	4.9	3.8	4.1	4.6	4.6	4.4	4.4		95.0	96.0	95.3	92.3	92.8	93.0	14
15	5.0	3.9	5.5	4.1	4.1	5.7	5.7	3.9	4.7	4.7	5.8	4.4	4.1	5.2		96.5	95.8	92.5	92.5	94.0	15
16	3.9	4.9	4.4	4.7	4.7	4.6	4.6	3.3	4.1	4.1	5.2	3.3	3.3	4.1	3.6		97.3	92.5	93.0	93.5	16
17	4.1	5.2	5.2	4.9	4.9	4.9	4.9	3.6	4.4	4.4	5.5	4.1	4.1	4.9	4.4	2.8		91.8	92.3	93.8	17
18	8.9	9.5	10.0	9.2	8.6	9.1	9.1	8.3	8.6	8.6	9.2	7.2	7.2	8.3	8.0	8.0	8.9		95.0	95.8	18
19	8.3	8.8	9.4	8.6	8.0	8.8	8.8	7.7	8.0	8.0	8.6	7.7	7.2	7.7	8.0	7.4	8.3	5.2		94.8	19
20	7.1	8.3	8.2	8.0	7.4	7.4	7.4	6.6	6.9	6.9	7.4	5.5	6.6	7.4	6.3	6.9	6.6	4.4	5.5		20
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	

Figura 16. Análise de identidade e divergência, pelo método ClustalX, das amostras seqüenciadas na região E1 do vírus da rubéola (401 nt) que pertencem ao genótipo 1G

Tabela 7- Resultados de Máxima e Mínima Similaridade pelo método ClustalX, das amostras seqüenciadas na região E1 do vírus da rubéola.

Sequencias Isoladas	Virus Padrão GeneBank	Genótipo	Similaridade	
			Máxima	Minima
Genótipo 1a	Cen_1a	1a	99,80%	98,30%
	B32_1B	1B	97%	95,50%
	ANI_1C	1C	96,30%	95,00%
	NC JP90_1D	1D	96,30%	95,00%
	CAS_1E	1E	97,30%	95,50%
	AH2_1F	1F	96,50%	95,30%
	BR_1G	1G	95,80%	94,30%
	BRD1CH79_2A	2A	94,30%	92,50%
	IS68_2B	2B	93,80%	91,50%
	C74_2C	2C	95,30%	94,00%
Genótipo 1G	BR_1G	1G	98,80%	97,50%
	Cen_1a	1a	97,00%	96%
	B32_1B	1B	97,3%	96,30%
	ANI_1C	1C	96,30%	94,80%
	SAI_1D	1D	96,30%	94,50%
	CAS_1E	1E	96,30%	95,30%
	AH2_1F	1F	96,00%	95,00%
	BRD1CH79_2A	2A	92,30%	91,30%
	IS68_2B	2B	92,80%	91,3%
	C74_2C	2C	93,50%	92,30%

Gráfico 7- Distribuição dos genótipos encontrados em São Paulo no período de 1997 a 2004.

Tabela 8- Resultado dos genótipo obtidos das sequências amplificadas pela região E1 do vírus da rubéola

Paciente Caso n°	Diagnóstico Clínico	Identificação	Ano	Genótipo
1	rubéola	R Vi/SP01.BRA/97	1997	1a
2	CRS (RN)	R Vi/SP01.BRA/98	1998	1a
3	hepatite fulminante	R Vi/SP01.BRA/99	1999	1a
4	encefalite	R Vi/SP02.BRA/99	1999	1a
5	rubéola	R Vi/SP03.BRA/99	1999	1a
6	rubéola	R Vi/SP01.BRA/00	2000	1g
7	rubéola	R Vi/SP2.BRA/00	2000	1a
8	rubéola	R Vi/SP3.BRA/00	2000	1a
9	rubéola	R Vi/SP4.BRA/00	2000	1g
10	rubéola	R Vi/SP5.BRA/00	2000	1g
11	rubéola	R Vi/SP6.BRA/00	2000	1a
12	rubéola	R Vi/SP7.BRA/00	2000	1a
13	rubéola	R Vi/SP8.BRA/00	2000	1a
14	rubéola	R Vi/SP9.BRA/00	2000	1g
15	rubéola	R Vi/SP10.BRA/00	2000	1g
16	rubéola	R Vi/SP11.BRA/00	2000	1a
17	rubéola	R Vi/SP12.BRA/00	2000	1a
18	rubéola	R vi/SP13.BRA/00	2000	1a
19	rubéola	R vi/SP14.BRA/00	2000	1a
20	rubéola	R Vi/SP01.BRA/01	2001	1a
21	rubéola	R Vi/SP02.BRA/01	2001	1a
22	reinfecção	R Vi/SP01.BRA/02	2002	1g
23	(Mãe)	R Vi/SP02.BRA02	2002	1g
24	SRC (RN)	R Vi/SP03.BRA02/CRS	2002	1g
25	ICR	R Vi/SP04.BRA02/CR I	2002	1g
26	rubéola	R Vi/SP01.BRA/03	2003	1g
27	reinfecção	R Vi/SP01.BRA/04	2004	1a
28	reinfecção	R Vi/SP02.BRA/04	2004	1a
29	reinfecção	R Vi/SP03.BRA/04	2004	1a

6 DISCUSSÃO

A rubéola é uma doença infecciosa viral aguda, que acomete crianças, adolescentes e adultos jovens. A rubéola é uma doença de importância devido à ocorrência da SRC atingindo o feto de mães infectadas durante a gestação e pode acarretar inúmeras complicações.

Os vírus da rubéola caracterizados, neste estudo foram isolados em diferentes áreas do estado de São Paulo, em diferentes períodos: 1997-1999; durante a epidemia de 2000-2001; e após o surto nos anos de 2002-2004. No período de 1992 a 2000, o Estado de São Paulo, à semelhança do que ocorreu com o sarampo, verificou-se o deslocamento da faixa etária para a população de adultos jovens. No presente estudo, os casos relacionados a epidemia de 2000 e 2001, na maioria, são mulheres nesta faixa etária e não vacinadas. Estudo, de soroprevalência, realizado por Figueiredo et al.(2009) mostrou que o percentual de indivíduos com anticorpos da classe IgG contra a rubéola na faixa etária de 20-29 anos foi de 82,35%, abaixo daquela observada em faixas etárias inferiores ou superiores. Os resultados mostram que a faixa etária de 20-29 anos do sexo feminino oferecia meio de circulação para o vírus da rubéola por concentrar a maioria dos suscetíveis acumulados ao longo dos anos, ou por não terem sido alvo das campanhas de vacinação a partir de 1992 ou não terem adquirido a doença naturalmente. No estado de São Paulo, frente a estes resultados, foi realizada em 2001 uma campanha vacinal onde 4.408.844 mulheres entre 15 a 29 anos de idade foram vacinadas. A cobertura vacinal geral foi de 91,6%, sendo 100% para a faixa etária entre 15 a 19 anos, 89% na faixa etária de 20 a 24 anos e 82,8% entre a faixa etária de 25 a 29 anos de idade. Após esta campanha, houve redução da incidência de 3,95 para 0,33 casos/100.000 habitantes em 2001 e 2004, respectivamente.

Entre os casos incluídos neste estudo, temos dois casos que apresentaram complicações graves após infecção pelo vírus da rubéola: insuficiência hepática aguda e encefalite.

A Insuficiência hepática aguda em crianças é uma disfunção grave, sem história prévia de doença no fígado (SQUIRES, 2007). Diversos fatores podem desencadear esta doença em crianças de mais de um ano, como as

hepatites virais, exposição a drogas, alterações no sistema imune, doenças metabólicas ou infecciosas, entretanto, a grande maioria dos casos relatados, a etiologia é desconhecida. No caso descrito, foram investigados todos os fatores que poderiam levar a insuficiência hepática aguda: agentes infecciosos (vírus e bactérias), alterações metabólicas, doenças auto imunes, imunodeficiências. Os resultados mostraram que o paciente teve infecção pelo vírus da rubéola, isolado e amplificado do sangue e posteriormente, do explante do fígado. Além disso, os resultados anatomo patológicos confirmaram o diagnóstico de hepatite, com detecção imunohistoquímica do antígeno da rubéola (proteína E1) nos hepatócitos, células de Kupffer e células endoteliais, demonstrando que houve replicação viral ativa no fígado (FIGUEIREDO et al., 2010).

A encefalite é uma complicação rara que pode ocorrer após a infecção pelo vírus da rubéola, normalmente os sintomas iniciam no intervalo de 1 a 8 dias após o aparecimento do exantema. Os principais sintomas neurológicos são dor de cabeça, ataxia e hemiplegia. Alterações da consciência, coma, convulsões raramente são descritos (FREY, 1997). A grande maioria dos casos de encefalite pelo vírus da rubéola ocorrem em crianças, sendo rara em adultos jovens (CHANG et al., 1997; LAU et al., 1998; MERRER et al., 1999; GARLICKI et al., 1998; SQUADRINI et al., 1977). Embora a determinação do fator etiológico é muito importante para o tratamento das encefalites, na grande maioria das vezes, este agente não é identificado. Os relatos publicados de encefalite devido ao vírus da rubéola, na sua grande maioria, o diagnóstico é confirmado apenas pela presença de anticorpos da classe IgM ou IgG no soro e no líquido cefalorraquidiano por teste imunoenzimático (ELISA). No presente caso, o vírus foi isolado e amplificado do líquido cefalorraquidiano, indicando que o vírus tem a capacidade de invadir o sistema nervoso central (FIGUEIREDO et al., 2010). BECHAR et al. (1982) proporam que a patogênese das complicações neurológicas, após infecção pelo vírus da rubéola, pode estar relacionada a dois mecanismos básicos: a invasão direta do vírus no sistema nervoso central e da resposta imune do hospedeiro. A recuperação do vírus da rubéola no líquido cefalorraquidiano, demonstra que pode ocorrer a invasão do vírus dentro do sistema nervoso central e multiplicação viral. As encefalites por RV apresentam uma taxa de mortalidade de 7,8% a 20%, sendo que aproximadamente 24% dos pacientes apresentam seqüelas após a infecção (DWYER et al., 1992).

As primeiras vacinas produzidas para controle da rubéola foram licenciadas em 1969 e programas eficazes de vacinação levaram a eliminação da rubéola e da SRC em algumas cidades (ROBERTSON et al., 2003). Normalmente, a vacina da rubéola é produzida em combinação com o sarampo (SR) ou sarampo e caxumba (SCR). Cerca de 95% da população vacinada desenvolve uma resposta imunológica que pode persistir até 20 anos após a vacinação (HOBMANN; CHANTLER, 2007). Neste estudo, dos quatro casos de reinfecção, dois casos apresentaram soroconversão, após a infecção natural, confirmada por sorologia positiva IgM/IgG e dois vacinados contra sarampo/rubéola no ano de 2001, após a epidemia que ocorreu no estado de São Paulo, com sorologia positiva IgG. Estes pacientes não apresentavam qualquer sinal de imunodeficiência e não foram submetidos a nenhum tratamento antiviral. Casos de reinfecção são raros, e podem ocorrer em pessoas com a imunidade induzida pela vacina ou em pessoas que adquiriram a imunidade pela doença. A reinfecção do vírus, adquirida naturalmente após a vacinação, pode variar entre 10 e 22%, uma taxa dez vezes maior entre os indivíduos que possuem baixos níveis de anticorpos contra rubéola após a infecção natural (HOBMANN; CHANTLER, 2007). A realização do teste de avidéz de anticorpos permitiu distinguir uma infecção primária recente de uma infecção passada ou reinfecção. A identificação de anticorpos de baixa avidéz com índices de avidéz igual ou inferior a 30%, sugere infecção primária recente e acima destes valores, infecção antiga. Estudo realizado por Valloup-Fellous e Grangeot-Keros (2007) mostrou que após 6 meses ou mais após a infecção primária ou vacinação, todos os pacientes apresentaram um índice maior de 70% utilizando a técnica de avidéz para avaliação sorológica.

Os nossos resultados mostraram que técnica de RT-PCR direta do material biológico apresentaram alta positividade quando comparada com o isolamento. O alto percentual de positividade por este método também foi encontrado por outros autores (BOSMA et al., 1985a, OLIVEIRA et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2004). Entre os casos aqui estudados, três amostras de urina e uma de sangue colhidas no primeiro dia de exantema foram negativas pelo teste de RT-PCR e positivas para o isolamento viral. Este resultado mostra que a carga viral da amostra escolhida foi extremamente importante para o diagnóstico da rubéola, reduzindo a possibilidade de resultados falso negativos. Não podemos esquecer que o isolamento viral em cultura de células continua sendo considerado

o padrão ouro para a detecção de rubéola em amostras biológicas. A rubéola cresce em uma variedade de linhagens celulares, porém o crescimento viral é lento e o seu efeito citopático é de difícil visualização (Frey TK, 1994). Neste estudo, as linhagens celulares Vero e SIRC foram utilizadas para o isolamento viral, visto que estas linhagens são mais eficientes para o isolamento e propagação do vírus da rubéola (HOBMANN; CHANTLER, 2005). Durante a realização deste estudo, as células SIRC apresentaram alta sensibilidade e maior visibilidade do efeito citopático (FIGUEIREDO et 2009b). A visualização do efeito citopático nas células Vero é mais difícil pelo fato que estas células crescem formando mais de uma camada celular. As passagens sucessivas realizadas, elevaram a taxa de positividade nos isolamentos. Entretanto, o isolamento viral, é uma técnica mais demorada quando comparada a RT-PCR. Devido as passagens sucessivas, os resultados do isolamento só estariam disponíveis após aproximadamente 21 a 30 dias. Em contrapartida, a técnica de RT-PCR é um método rápido e eficiente, porém é necessário que a amostra chegue ao laboratório em boas condições de transporte da mesma. Estes resultados confirmam os achados por Bosma et al. (1995b), Revello et al. (1997) e Andrade et al. (2006) que estudaram casos de infecção materna. O diagnóstico clínico e laboratorial das infecções congênitas não é uma tarefa fácil, pois aproximadamente 50% das gestantes são assintomáticas. A ultra-sonografia tem valor limitado nos casos sem acometimento grave e o diagnóstico intra utero possui o risco do próprio procedimento. Os recém nascidos infectados, muitas vezes são assintomáticos, e uma análise minuciosa deve ser feita para detecção das mínimas alterações clínicas nos mesmos (BEST, 2007). Além disso, em alguns casos de SRC o recém-nascido tem ausência de IgM, devido a imaturidade do sistema imune fetal, pois este não tem condições organogênicas de produzir a imunoglobulina M, dificultando assim a sua utilização como diagnóstico (ENDERS; JONATHA, 1987; ANDRADE et al., 2006). Embora o feto se torne capaz de produzi-los ao redor da 20ª semana de gestação, os anticorpos IgM, parecem não conseguir combater completamente o vírus do organismo fetal, apesar de sua atividade neutralizantes quanto testado *in vitro* (COOPER; PRELUB; ALFORD, 1995; KATOW, 1998). Quanto a sorologia materna a situação pode ser inversa, apresentando IgM falso positiva. Em uma gestante sem história de infecção pelo vírus da rubéola, o resultado de IgM positiva, pode significar infecção recente assintomática, reinfecção, resultado falso positivo ou

reação cruzada com outros agentes infecciosos (BEST et al., 2007; HOFMANN e LIEBERT, 2005).

Os estudos moleculares baseados na sequência viral do gene E1 do vírus da rubéola, classificou o vírus da rubéola em dois grupos: 1 e 2. O grupo 1 está presente na Europa, Norte da América, Ásia e grupo II na Ásia e recentemente, América do Sul e Europa (WHO, 2005).

Os vírus da rubéola isolados e sequenciados neste estudo, quando comparados a uma coleção de vírus de referência mundial disponíveis no GenBank, mostrou que as amostras virais circulantes em São Paulo, pertencem ao grupo 1, genótipos 1a e 1G.

O genótipo 1a está presente desde 1997 e também durante a epidemia que ocorreu em 2000 e 2001. Esse genótipo foi primeiramente descrito em 2002 e recentemente em 2007 associado a Síndrome de Guillain-Barré (REEF et al., 2002; FIGUEIREDO et al., 2008, 2010). Este genótipo pertence aos vírus isolados entre os anos de 1961 a 1986 que compreendem o grupo de genótipo clássico internacional. Durante o período de 1966 a 1990 esse genótipo foi isolado nos Estados Unidos da América, nas cidades da Califórnia, Geórgia, Michigan, Nova York e Ohio e na Europa onde ele foi predominante na Bélgica e Inglaterra (ICENOGLE et al., 2004; ZHENG et al, 2003a). Zheng et al. (2003b) encontrou este genótipo na Itália em 1991 e 1997. Este genótipo não tem sido freqüente nos últimos anos, entretanto, nos anos 2000 a 2002, este genótipo foi isolado em Myanmar e Mongólia (WHO, 2005). Os isolados em Myanmar foram amostras biológicas de crianças infectadas pelo vírus da rubéola durante o surto que ocorreu na cidade de Yagon (THANT et al., 2006). Recentemente, o genótipo 1a foi isolado em Honduras (comunicação pessoal, Joseph Icenogle, responsável pelo Setor de Rubéola do CDC).

O genótipo 1G foi isolado durante a epidemia de 2000-2001, e persistiu até 2003. Este genótipo foi isolado na Europa, África, Ásia e no Brasil, na cidade do Rio de Janeiro (HAHNÉ et al., 2009; WHO, 2007, 2005; DONADIO et al., 2003). Portanto, em São Paulo, houve a circulação destes dois genótipos durante o período analisado: 1997 a 2004. Alguns estudos, demonstraram co-circulação de genótipos distintos durante o mesmo surto (ZHU, Z et al., 2010; ZHENG et al., 2003; DONADIO et al. 2003).

Este estudo é pioneiro no país e o primeiro a seqüenciar e analisar os genótipos desse vírus detectado em um grande numero de amostras. No futuro, a epidemiologia molecular ajudará a monitorar o caminho da transmissão do vírus da rubéola através do mundo e identificar vírus

7 CONCLUSÕES

- A. A PCR pode ser utilizada para detecção do vírus da rubéola em amostras clínicas.
- B. As amostras do vírus da rubéola isoladas e seqüenciadas foram do grupo 1, genótipos 1a e 1G. Estes dois genótipos foram os responsáveis pela epidemia de 2000 que ocorreu no Estado de São Paulo.
- C. O genótipo 1a foi pela primeira vez detectado nas Américas.
- D. A pesquisa mostrou que a associação das técnicas de isolamento viral e PCR possibilitou a detecção do primeiro caso de hepatite fulminante pelo vírus da rubéola.
- E. Primeiro relato na literatura de isolamento e sequenciamento gênico do vírus da rubéola em líquido cefalorraquidiano de um caso de encefalite por rubéola.

REFERÊNCIAS*

ABOUDY, Y.; BARNEA, B.; YOSEF, L.; FRANK, T.; MENDELSON, E. Clinical rubella reinfection during pregnancy in a previously vaccinated woman. **J. Infect.**, v. 41, n.2, p.187-189, 2000.

ALEM, A.; TAMOURT, O. Congenital rubella resulting from maternal reinfection. **Arch. Inst. Pasteur Alger.**, v. 62, p. 226-231, 1998.

ALAIN, R.; NADON, F.; SEGUIN, C.; PAYMENT, P.; TRUDEL, M. Rapid virus subunit visualization by direct sedimentation of samples on electron microscope grids. **J. Virol. Methods**, v.16, p. 209-216, 1987.

ANDRADE, J. Q.; BUDUNKI, V.; FIGUEIREDO, C. A.; OLIVEIRA, M. I.; CURTI, S.P.; ZUGAIB, M. Detection of rubella virus in placental tissue of the first case of congenital rubella infection during the rubella epidemic in São Paulo, Brazil in 2007/2008. **J. Clin. Virology**, 2010. In press.

ANDRADE, J. Q.; BUDUNKI, V.; CURTI, S. P.; FIGUEIREDO, C. A.; OLIVEIRA, M. I.; ZUGAIB, M. Rubella in pregnancy intrauterine transmission and perinatal outcome during a Brazilian epidemic. **J. Clin. Virology**, v. 35, n. 3, p. 285-291, 2006.

ASSAAD, F. LJUNGARS-ESTEVEZ, K. Rubella world impact. **Rev. Infect. Dis.**, v. 7, n. 1, p. 29-36, 1985.

BALL, L. A. Viruses and replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed). **Fields Virology**. Philadelphia, 1996. p. 825.

BARDELETT, G.; KESSLER, N.; AYMARD-HENRY N. Morphology biochemical analysis and neuraminidase activity of rubella virus. **Arch.Virol.** v. 49: 17-186, 1975.

BARFIELD, W.; GARDNER, R.; LETT, S.; JOHNSON, C. Congenital rubella reinfection in a mother with anti-cardiolipin and anti-platelet antibodies. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.16, n. 2, p. 249-251, 1997.

BARON, S. **Medical Microbiology**. Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

BART, W.; STETLER, H. C.; PREBLUD, S. R. Fetal risk associated with rubella vaccine: an update. **Rev. Infect. Dis.**, v. 7, p. 95-102, 1985.

□ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS **NBR 6023:**

Informação e documentação: Referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BECHAR, M.; DAVIDOVICH, S.; GOLDHAMMER, G.; MACHTEY, I.; GADOTH, N. Neurological complications following rubella infection. **J. Neurol.**, v. 226, p. 283-287, 1982.

BEST, J. M. Rubella virus. In: LENNETTE, D. A., LENNETTE, E. (Ed.) **Diagnostic procedures for viral rickettsial and chlamydial infections**. New York, 1995. p. 725.

BEST, J.M.; BANATVALA, J. E. Rubella. In: ZUCKERMAN, A. J.; BANATVALA, J. E.; PATTISON, J.R. (Ed.). **Principles and practice of clinical virology**. London, 2000. p. 387–418.

BEST, J. M.; CASTILLO-SOLORZANO, C.; SPIKA, J. S.; ICENOGLE, J.; GLASSER, J. W.; GAY, N. J.; ANDRUS, J.; ARVIN, A. M. Reducing the global burden of congenital rubella syndrome: report of the world health organization steering committee on research related to measles and rubella vaccines and vaccination. **J. Infect. Dis.**, v. 192, p. 1890-1897, 2005.

BEST, J. M. Rubella. **Semin. Fetal Neonatal Med.**, v. 12, n.3, p.182-192, 2007.

BOSMA, T. J.; CORBETT, K. M.; O'SHEA, S.; BANATVALA, J. E.; BEST, J. M. PCR for detection of rubella virus RNA in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 11, p.1075–1079, 1995a.

BOSMA, T. J.; CORBETT, K. M.; ECKSTEIN, M. B.; O'SHEA, S.; VIJAYALAKSHMI, P.; BANATVALA, J. E.; MORTON, K.; BEST, J. M. Use of PCR for prenatal and postnatal diagnosis of congenital rubella. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 11, p.2881-2887, 1995b.

BOWDEN, D. S. and WESTAWAY, E. G. Rubella virus products and their distribution in infected cells. **Subcell. Biochem.**, v. 15, p. 203-231, 1989.

BOTTIGER, B.; JENSEN, I. P. Maturation of rubella IgG avidity over time after acute rubella infection. **Clin. Diagn. Virol.**, v. 8, p. 105–111, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/> . Acesso em: 14 mar 2010.

CAIDI, H.; ABERNATHY, E. S.; BENJOUAD, A.; SMIT, S.; BWOGI, J.; ANYUNJA, M. Phylogenetic analysis of rubella viruses found in Morocco, Uganda, Cote d'Ivoire and South Africa from 2001 to 2007. **J. Clin. Virol.**, v. 42, n. 1, p. 86-90, 2008.

CASTILLO-SOLÓRZANO, C.; CARRASCO, P.; TAMBINI, G.; REEF, S.; BRANA, M.; DE QUADROS, CA. New horizons in the control of rubella and prevention of congenital rubella syndrome in the Americas. **J. Infect. Dis.**, v. 15, n. 187, p.146-152, 2003.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/Cve_dex.htm. Acesso em : 20 mar. 2010

CHANG, D. I.; PARK, J. H.; CHUNG, K. C. Encephalitis and polyradiculoneuritis following rubella virus infection-a case report. **J. Korean Med. Sci.**, v.12, n. 2, p. 168-170, 1997.

CHANTLER, J.; WOLINSKY, J. S.; TINGLE, A. Rubella virus. In: FIELDS, B. N.; SNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia, 1996. p. 899

CHANTLER, J. K. Detection of rubella virus infection by polymerase chain reaction. In: BECKER, Y. (Ed.) **PCR: Protocols for Diagnosis of Human and Animal Viral Diseases**. Berlin, 1997, p. 335.

CHEN, W.; LANDAU, S.; SHAM, P.; FOMBONNE, E. No evidence for links between autism, MMR and measles virus. **Psychol. Med.**, v. 34, p. 543–553, 2004.

CHEZ, M. G.; CHIN, K.; HUNG, P. C. Immunizations, immunology, and autism. **Semin. Pediatr. Neurol.**, v. 11, p. 214–217, 2004.

COFFIN, S. E. MMR and autism: moving from controversy toward consensus. **Expert Rev. Vaccines**, v. 1, p. 145–150, 2002.

COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Alerta rubéola. **BEPA, Bol. Epidemiol. Paul. (Online)**, v. 4, n. 44, p. 18-20, 2007. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa44_rubeola.htm. Acesso em: 10 mar. 2010

COOPER, L. A.; PRELUB, S. R.; ALFORD, C. A. Rubella. In: REMINGTON J. S.; KLEIN, J. O (Ed). **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. Philadelphia, 1995. p.268.

CRADOCK-WATSON, J. E.; MILLER, E.; RIDEHALGH, M. K. S.; TERRY, G. M.; HO-TERRY, L. Detection of rubella virus in fetal and placental tissues and in throats of neonates after serologically confirmed rubella in pregnancy. **Pren. Diag.**, v. 9, p. 91-96, 1989.

CURTI, S. P. Rubella Molecular Epidemiology in the State of São Paulo, Brazil. In: PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Informal Consultation of Measles and Rubella Laboratory Network in Preparedness to Document the Elimination**. Washington, DC: Pan American Health Organization, 2008.

CUSI, M. G.; ROSSOLINI, G. M.; VALENSIN, P. E.; CELLESI, C.; ZANCHI, A. Serological evidence of reinfection among vaccinees during rubella outbreak. **Lancet**, v. 129, n. 1-4, p. 337-340, 1990.

CUSI, M. G.; VALENSIN, P. E.; CELLESI, C. Possibility of reinfection after immunisation with RA27/3 live attenuated rubella virus. **Arch. Virol.**, v. 129, n. 1-4, p. 337-340, 1993.

DAVIDKIN, I.; JOKINEN, S.; BROMAN, M.; LEINIKKI, P.; PEELTOLA, H. Persistente of measles, mumps, and rubella antibodies in an MMR-vaccinated cohort: a 20-year follow-up. **J. Infect. Dis.**, v. 197, n. 7, p. 950-956, 2008.

DOMINGUEZ, G. C.; WANG, Y.; FREY, T. K. Sequence of the genome RNA of rubella vírus: evidence for genetic rearrangement during togavirus evolution. **Virology**, v. 177, p. 225-238, 1990.

DONADIO, F. F.; SIQUEIRA, M. M.; VYSE, A.; JIN, L.; OLIVEIRA, S. A. The genomic analysis of rubella virus detected from outbreak and sporadic cases in Rio de Janeiro state, Brazil. **J. Clin. Virol.**, v. 27, n. 2. p. 205-209, 2003.

DWYER, D. E.; HUESTON, L.; FIELD, P. R.; CUNNINGHAM, A. L.; NORTH, K. Acute encephalitis complicating rubella virus infection. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, vol. 11, p. 238-240, 1992.

ENDERS, G.; JONATHA, W. Prenatal diagnosis of intrauterine rubella. **Infection**, v. 15, p. 162-164, 1987.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Eds) **Virus Taxonomy, Willth Report of the ICTV**. Elsevier Academic Press, London, 2004. p. 1258.

FIGUEIREDO, C. A.; OLIVEIRA, M. I.; AFONSO, A. M. S, THEOBALDO, M.; CRUZ, A.S.; CURTI, S.P. Isolation of the wild-type rubella virus in rabbit kidney cell line RC-IAL. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 40, n. 2, p. 69-73, 2004.

FIGUEIREDO, C. A.; AFONSO, A. M. S.; CURTI, S. P.; OLIVEIRA, M. I.; SOUZA, L. T. M. Soroprevalência da Rubéola na região urbana e rural de Guaratinguetá, São Paulo, 2000. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, v. 55, n. 2, p. 117-120, 2009a

FIGUEIREDO, C. A.; OLIVEIRA, M. I.; AFONSO, M. A. S.; CURTI, S. P. Growth of rubella virus into SIRC (rabbit cornea cell line) using various culture media. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 145-149, 2009b.

FIGUEIREDO, C. A.; KLAUTAU, G. B.; AFONSO, A .M. S, OLIVEIRA, M. I.; CURTI, S.P. et al. Isolation and genotype analysis of rubella virus from a case of Guillain-Barré syndrome. **J. Clin. Virology**, v. 43, p. 343–345, 2008.

FIGUEIREDO, C. A.; CORDOVANI, N.T.B.; CASTRIGNANO, S. B.; ALVES, V. A.; KANAMURA, C. T.; OLIVEIRA, M. I. Acute liver failure associated with rubella virus in a child. **Pediatr. Infec. Dis.**, v. 29, n. 6, p. 573-574, 2010.

FIGUEIREDO, C. A.; OLIVEIRA, M. I.; AFONSO, A. M. S.; CURTI, S. P.; DURIGON, E. L. Rubella encephalitis in a young adult male: Isolation and genotype analysis. **Infection**, 2010. In press.

FORBES, J. A. Rubella: historical aspects. **Am. J. Dis. Chil.**, v. 118, p. 5-11, 1969.

FREY, T. K.; ABERNATHY, E. S.; BOSMA, T. J.; STARKEY, W. G.; CORBETT, K. M.; BEST, J. M. Molecular analysis of Rubella virus Epidemiology across three Continents North America, Europe and Asia, 1961-1997. **J. Infect. Dis.**, v. 178, p. 642-50, 1998.

FREY, T. K. Neurological aspects of rubella virus infection. **Intervirology**, v. 40, n. 2-3, p. 167-75, 1997.

FREY, T. K. Molecular biology of rubella virus. **Adv. Virus Res.**, v. 44, p. 69-160, 1994.

FREY, T. K.; ABERNATHY, E. S. Identification of strain-specific nucleotide sequences in the RA 27/3 rubella virus vaccine. **J. Infect. Dis.**, v. 168, p. 854-864, 1993.

GARLICKI, A.; BOCIAGA-JASIK, M.; GARLICKA, Z.; KRUKOWIECKI, J. Encephalitis as a severe complication of rubella-case report. **Przegl Lek** v. 55, n. 9, p. 488-489, 1998.

GREEN, K. Y.; DORSETT, P. H. Rubella virus antigens: localization of epitopes involved in hemagglutination and neutralization by using monoclonal antibodies. **J. Virol.**, v. 57, n. 3, p. 893-898, 1986.

GREEN, R. H.; BALSAMO, M. R.; GILES, J. P.; KRUGMAN, S.; MIRICK, G. S. Studies of the natural history and prevention of rubella. **Am. J. Dis. Child.**, v. 110, n. 4, p. 348-365, 1965.

HAHNÉ, S.; MACEY, J.; VAN BINNENDIJK, R.; KOHL, R.; DOLMAN, S.; VAN DER VEEN, Y. et al. Rubella outbreak in the Netherlands, 2004-2005: high burden of congenital infection and spread to Canada. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 28, n. 9, p. 795-800, 2009.

HALSTEAD, S. B.; DIWAN, A. J. Failure to transmit rubella virus vaccine. A close contact study in adults. **JAMA**, v. 215, p. 634-636, 1971.

HAMKAR, R.; JALILVAND, S.; ABDOLBAGHI, M. H.; JELYANI, K. N.; ESTEGHAMATI, A.; HAGH-GOO, A.; MOHKTARI-AZAD, T.; NATEGH, R. Distinguishing between primary infection and reinfection with rubella vaccine virus by IgG avidity assay in pregnant women. **East. Mediterr. Health. J.**, v. 15 n.1, p. 94-103, 2009.

HAMKAR, R.; JALILVAND, S.; MOKHTARI-AZAD, T.; NOURI, J. K.; DAHI-FAR, H.; SOLEIMANJAH, H.; NATEGH, R. Assessment of IgM enzyme immunoassay and IgG avidity assay for distinguishing between primary and secondary immune response to rubella vaccine. **J. Virol. Methods**, v. 130, n. 1-2, p. 59-65, 2005.

HOBMAN, T. and CHANTLER, J. Rubella virus. In: Knipe D.M.; Howley, P.M. (Ed). **Fields virology**, Philadelphia, 2007. p. 1069.

HOFMANN, J. and LIEBERT, U.G. Significance of avidity and immunoblot analysis for rubella IgM positive serum samples in pregnant women. **J. Virol. Methods**, v. 130, n.1 -2, p. 66-71, 2005.

HOFMANN, J.; RENZ, M.; MEYER, S.; von HAESELER, A.; LIEBERT, U.G. Phylogenetic analysis of rubella virus including new genotype I isolates. **Virus Res.**, v. 96, p. 123-128, 2003.

HORSTMANN, D. M. Rubella. In: EVANS, A. S. (Ed.) **Viral Infections of humans. Epidemiology and control**. New York, 1976. p. 400.

HORSTMANN, D. M.; LIEBHABER, H.; LE BOUVIER, G. L.; ROSENBERG, D. A.; HALSTEAD, S. B. Rubella: reinfection of vaccinated and naturally immune persons exposed in an epidemic. **N. Engl. J. Med.**, v. 283, n. 15, p. 771-8, 1970.

HORSTMANN, D. M.; PAJOT, T. G.; LIEBHABER, H. Epidemiology of rubella: sub clinical infection and occurrence of re-infection. **Am. J. Dis. Child.**, v.118, p. 133-136, 1969.

HO-TERRY, L.; TERRY, G. M.; LONDESBOROUGH, P. Diagnosis of foetal rubella virus infection by polymerase chain reaction. **J.Gen.Virol.** v. 71, p. 1607-1611, 1990.

ICENOGL, J. P.; FREY, T. K.; ABERNATHY, E. et al. Genetic analysis of rubella viruses found in the United States between 1966 and 2004: evidence that indigenous rubella viruses have been eliminated. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 3, p. 33-40, 2006.

JIN, L.; THOMAS, B. Application of molecular and serological assays to case based investigations of rubella and congenital rubella syndrome. **J. Med. Virol.**, v. 79, n. 7, p. 1017-1024, 2007.

KAKIZAWA, J.; NITTA, Y.; YAMASHITA, T.; USHIJIMA, H.; KATOW, S. Mutations of rubella virus vaccine TO-336 strain occurred in the attenuation process of wild progenitor virus. **Vaccine**, v. 19, n. 20, p. 2793-2802, 2001.

KATOW, S. Rubella virus genome diagnosis during pregnancy and mechanism of congenital rubella. **Intervirology**, v. 41, p. 163-169, 1998.

KATOW, S.; MINAHARA, H.; FUKUSHIMA, M.; YAMAGUCHI, Y. Molecular epidemiology East Asian countries. **J. Infect. Dis.**, v. 176, p. 1244-1245, 2001.

KUDESIA, G.; MCKENDRICK, M.; MORGAN-CARPNER, P.; THOMAS, H. I. Clinical rubella reinfection-a case of arthropathy. **J. Infect.**, v. 23, n. 1, p. 81-83, 1991.

LAU, K. K.; LAI, S. T.; LAI, J.Y.; YAN, W. W.; SO, T. M.; WONG, T. Y. Acute encephalitis Hong Kong. **Med. J.**, v. 4, n. 3, p. 325-328, 1998.

LEE, J. Y. and BOWDEN, D. S. Rubella virus replication and Links to teratogenicity. **Clin. Micr. Rev.**, v. 13, n. 4, p. 571-587, 2000.

LINDEGREN, M. L.; FEHRS, L. J.; HADLER, S. C.; HINMAN, A. R. Update: rubella and congenital rubella syndrome, 1980-1990. **Epidemiol. Rev.**, v. 13, p. 341-348, 1991.

MASSAD, E.; AZEVEDO-NETO, R. S.; BURATTINI, M. N.; ZANETTA, D. M.; COUTINHO, F. A. Assessing the efficacy of a mixed vaccination strategy against rubella in São Paulo, Brazil. **Int. J. Epidemiol.**, v. 24, n. 4, p. 842-850, 1995.

MEITSCH, K.; ENDERS, G.; WOLINSKY, J. S.; FABER, R.; PUSTOWOIT, B. The role of rubella-immunoblot and rubella-peptide-EIA for the diagnosis of the congenital rubella syndrome during the prenatal and newborn periods. **J. Med. Virol.**, v. 51, p. 280-283, 1997.

MEYER, H. M. JR.; PARKMAN, P. D.; HOBBS, T. E.; LARSON, H. E.; DAVIS, W. J.; SIMSARIAN, J. P.; HOPPS, H. E. Attenuated rubella viruses. Laboratory and clinical characteristics. **Am. J. Dis. Child.**, v. 118, n. 2, p. 155-165, 1969.

MERRER, J.; PERIN-DUREAU, F.; APPÉRÉ, C.; PALMER, P.; SANTOLI, F.; DE JONGHE, B. et al. Severe forms of rubella encephalitis: arguments for a better vaccination policy. **Presse Méd.**, v. 28, p. 395-397, 1999.

MITCHELL, L. A.; TINGLE, A. J.; SHUKIN, R.; SANGEORZAN, J. A.; MCCUNE, J.; BRAUN, D. K. Chronic rubella vaccine-associated arthropathy. **Arch. Intern. Med.**, v. 153, p. 2268-2274, 1993.

MORGAN-CAPNER, P.; HAMBLING, M. H.; COLEMAN, T. J.; WATKINS, R. P.; STERN, H.; HODGSON, J.; DULAKE, C.; BOSWELL, P. A.; BOOTH, J.; BEST, J. M.; BANATVALA, J. E. Detection of rubella-specific IgM in sub clinical reinfection in pregnancy. **Lancet**, v. 1, n. 8423, p. 244-246, 1985(a).

MORGAN-CAPNER, P.; RODECK, C. H.; NICOLAIDE, K. Prenatal detection of rubella IgM in fetal sera. **Prenat Diagn** v.5, p. 21-23, 1985(b).

MULLER C. P.; KREMER, J. R.; BEST, J. M.; DOURADO, I.; TRIKI, H.; REEF, S.; WHO STEERING COMMITTEE FOR MEASLES AND RUBELLA. Reducing global disease burden of measles and rubella: report of the WHO Steering Committee on research related to measles and rubella vaccines and vaccination, 2005. **Vaccine**, v. 25, n. 1, p. 1-9, 2007.

MURPHY, F. A.; BISHOP, D. H. L.; FAUQUET, C. M. Virus Taxonomy, 6th report of international Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). **Arch. Virol.**, v. 10, p. 1-586, 1995.

OLIVEIRA, M. I.; CURTI, S. P.; FIGUEIREDO, C. A.; AFONSO, A. M. S.; THEOBALDO, M.; FELIPE, J. Detection of rubella virus RNA in serum samples by RT-PCR assay. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 37, n. 1, p. 24-27, 2001.

OU, D.; MITCHELL, L. A.; DÉCARIE, D.; TINGLE, A. J.; NEPOM, G. T. Promiscuous T-cell recognition of a rubella capsid protein epitope restricted by DRB1*0403 and DRB1*0901 molecules sharing an HLA DR supertype. **Hum. Immunol.**, v. 59, n. 3, p. 149-157, 1998.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Brazil accelerates control of rubella and prevention of congenital rubella syndrome. **EPI Newsletter**, v. 24, p.1–3, 2002.

PARKMAN, P. D.; BUESHER, E. L.; ARTENSTEIN, M. S. Recovery of rubella virus from the army recruits. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 111, p. 225-230, 1962.

PAYMENT, P.; ADJDUKOVIC, D.; PAVILANIS, V. Le veirus de la rubeole. I.Morphologic et proteins structurales. **Can. J. Microbiol.**, v. 21, p.703-709, 1975.

PLOTKIN, S. A.; FARQUHAR, J. D.; KATZ, M.; BUSER, F. Attenuation of RA 27-3 rubella virus in WI-38 human diploid cells. **Am. J. Dis. Child.**, v. 118, n. 2, p. 178-85, 1969

PLOTKIN, S. A.; FARQUHAR, J. D.; OGRA, P. L. Immunologic properties of RA27/3 rubella virus vaccine: a comparison with strains presently licensed in the United States. **JAMA**, v. 225, p. 585-90, 1973.

PLOTKIN, S. A.; REEF, S. Rubella vaccine. In: Plotkin, S.A.; Orenstein, W.A. (Eds). **Vaccines**. Philadelphia, 2004, p. 707.

POLK, B.F.; MODLIN, J.F.; WHITE, J.A.;DEGIROLAMI, P.C. A controlled comparison of joint reactions among women receiving one of two rubella vaccines. **Am. J. Epidemiol.**, v. 115, p. 19-25, 1982.

PREBLUD, S.R. and ALFORD, C. A. Rubella. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN J.O. (Ed). **Infectious diseases of the fetus and newborn infant** Philadelphia, 1968, p. 196.

PUGACHEV, K. V.; ABERNATHY, E. S.; FREY, T. K. Genomic sequence of the RA 27/3 vaccine strain of rubella virus. **Arch. Virol.**, v. 142, p. 1165-1180, 1997.

PUSTOWOIT, B. and LIEBERT, U. G. Predictive value of serological tests in rubella virus infection during pregnancy. **Intervirol.**, v. 41, p. 170-177, 1998.

RAJASUNDARI, T. A.; SUNDARESAN, P.; VIJAYALAKSHMI, P.; BROWN, D.W.; JIN. L. Laboratory confirmation of congenital rubella syndrome in infants: an eye hospital based investigation. **J Med.Virol.**, v. 80, n. 3, p. 536-546, 2008.

RAWLS, W. E. Congenital rubella: the significance of virus persistence. **Prog. Med. Virol.**, v. 10, p. 238-285, 1968.

REEF, S. E.; FREY, T. K.; THEALL, K.; et al. The changing epidemiology of rubella in the 1990s: on the verge of elimination and new challenges for control and prevention, **JAMA**, v. 287, p. 464–472, 2002.

REVELLO, M. G.; BALDANTI, F.; SARASINI, A.; ZAVATTONI, M.; TORSELLINI, M.; GERNA, G. Prenatal diagnosis of rubella virus infection by direct detection and semiquantitation of viral RNA in clinical samples by reverse transcription-PCR. **J. Clin. Micr.**, v. 35, p. 708-713, 1997.

ROBERTSON, S. E.; FEALTHESTONE, D. A.; GACIC-DOBO, M.; HERSH, B.S. Rubella and congenital rubella syndrome: global uptate. **Rev. Panam.Salud Public.**, v. 14, p. 306-315, 2003.

SANTIS, M. CAVALIERE, A. F.; STRAFACE, G.; CARUSO, A. Rubella infection in pregnancy. **Reprod. Toxicol.**, v. 21, n. 4, p. 390-8, 2006.

SÃO PAULO (Cidade). Prefeitura de São Paulo. Secretaria da Saúde. Disponível em: <http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/saude/vigilancia>. Acesso em: 27 jul. 2010.

SATO, H. K. Inadvertent rubella vaccination of pregnant women:The São Paulo experience in 2001. **J. Infect. Dis.**, 2010. In press.

SCHLESINGER, S, SCHLESINGER, M. *Togaviridae: the viruses and their replication*. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia, 2001. p. 697.

SEVER J. L.; NELSON, K. B.; GILKENSON, M. R. Rubella epidemic 1964: effect on 6000 pregnancies. **Am. J. Dis. Child.**, v. 110, p. 441-446, 1965

SIEGEL, M.; FUERST, H. T.; DUGGAN, W. Rubella in mother and congenital cataracts in child. Comparative data in periods with and without epidemics from 1957 to 1964, **JAMA**, v. 203, n. 9, p. 632-636, 1968.

SQUADRINI, F.; TAPARELLI, F.; DE RIENZO, B.; GIOVANNINI, G.; PAGANI, C. Rubella virus isolation from cerebrospinal fluid in postnatal rubella encephalitis. **Br. Med. J.**, v. 2, n. 6098, p. 1329–1330, 1977.

SQUIRES, R. H. Jr. Acute liver failure in children. *Semin Liver Dis* v. 28, p. 153–66, 2008

SKENDZEL, L. P. Rubella immunity. Defining the level of protective antibody. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 106, p. 170-174, 1996.

STEVENS A, WILSON I. The haematoxylin and eosin. In: Bancroft JD & Stevens A (Ed) **Theory and Practice of Histological Techniques**. New York, 1996. p. 99.

TERRY, G. M.; HO-TERRY, L.; WARREN, C.; RODECK, C. H.; COHEN, A.; REES, K. R. First trimester prenatal diagnosis of congenital rubella: a laboratory investigation. **Br. M. J.**, v. 292, p. 930-933, 1986.

THANT, K. Z.; OO W. M.; MYINT, T. T.; SHWE, T. N.; HAN, A. M. et al. Active surveillance for congenital rubella syndrome in Yangon, Myanmar. **Bull World Health Organ.**, v. 84, n. 1, p. 12-20, 2006.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. **Nucleic. Acids Res.**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

TINGLE, A. J.; MITCHELL, L. A.; GRACE, M.; MIDDLETON, P.; MATHIAS, R.; MACWILLIAM, L.; CHALMERS, A. Randomised double-blind placebo-controlled study on adverse effects of rubella immunisation in seronegative women. **Lancet**, v. 349, n. 9061, p. 1277-1281, 1997.

TONDURY, G.; SMITH, D. W. Fetal rubella pathology. **J. Pediatr.**, v. 68, p. 867-79, 1966.

UEDA, K. Development of the rubella vaccine and vaccination strategy in Japan. **Vaccine**, v. 27, n. 24, p. 3232-3233, 2009.

VAHERI, A.; HOVI, T. Structural and proteins units of rubella virus. **J. Virol.**, v. 9, p. 10-16, 1972.

VALINOTTO, L. E.; VIEGAS, M.; ACEVEDO, M. E.; BARRERO, P. R.; MISTCHENKO, A. S. Phylogenetic analysis of rubella viruses isolated in 2008 outbreak in Argentina. **J. Clin. Virol.**, v. 46, n. 3, p. 286-289, 2009.

VAULOUP-FELLOUS, C.; URSULET-DISER, J.; GRANGEOT-KEROS, L. Development of a rapid and convenient method for determination of rubella virus-specific immunoglobulin G avidity. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, n. 11, p. 1416-1419, 2007.

ZHENG, D. P.; FREY, T. K.; ICENOGLU, J.; KATOW, S.; ABERNATHY, E. S et al. Global distribution of rubella virus genotypes. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, n. 12, p. 1523-1530, 2003a.

ZHENG, D. P.; ZHU, H.; REVELLO, M. G.; GERNA, G.; FREY, T. K. Phylogenetic analysis of rubella virus isolated during a period of epidemic transmission in Italy, 1991-1997. **J. Infect. Dis.**, v. 15, p. 187, n. 10, p. 1587-97, 2003b.

ZHENG, D. P.; ZHOU, Y. M.; ZHAO, K.; HAN, Y. R.; FREY, T. K. Characterization of genotype II rubella virus strain. **Arch. Virol.**, v. 148, n. 9, p. 1835-1850, 2003c.

ZHU, Z.; ABERNATHY, E.; CUI, A.; ZHANG, Y.; ZHOU, S.; ZHANG, Z. et al. Rubella virus genotypes in the People's Republic of China between 1979 and 2007: a shift in endemic viruses during the 2001 Rubella Epidemic. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 5, p. 1775-81, 2010.

YONEDA, T.; URAD, M.; SAKUDA, M.; MIYAZAKI, T. Altered growth differentiation and responsiveness to epidermal growth factor of human embryonic mesenchymal cells of palate by persistent rubella virus infection. **J. Clin. Invest.**, v. 77, p. 1613-1621, 1986.

WEBSTER, W. S. Teratogen update: congenital rubella. **Teratology.**, v. 58, n. 1, p. 13-23, 1998.

WELLER, T. H.; NEVA, F. A. Propagation in tissue culture of cytopathic agents from patients with rubella-like illness. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 111, p. 215–225. 1962.

WITTE, J. J.; KARCHMER, A. W.; CASE, G.; HERRMANN, K. L.; ABRUTYN, E.; KASSANOFF, I.; NEILL, J. S. Epidemiology of rubella. **Am. J. Dis. Child.**, v. 118, n. 1, p. 107-11, 1969.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Update of standard nomenclature for wild-type rubella viruses. **Wkly Epidemiol. Rec.**, v. 82, n. 24, p. 216–222, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Standardization of the nomenclature for genetic characteristics of wild-type rubella viruses. **Wkly Epidemiol. Rec.**, v. 80, n. 80, p. 126-32, 2005.