

Optimização de um Protocolo de Reacção em Cadeia da Polimerase para o Diagnóstico de Infecção por Vírus do Sarampo

M. Gíria, H. Rebelo de Andrade

Unidade de Vírus Respiratórios e Entéricos
Instituo Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge - Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa | Tel. 217 526 455 | e-mail: hsrebelo.andrade@insa.min-saude.pt

RESUMO

Foram testados três protocolos experimentais para a detecção e amplificação, por reacção em cadeia da polimerase, de fragmentos dos segmentos codificantes para as proteínas Hemaglutinina (H), Nucleocápside (N) e Matriz (M), do genoma do vírus do sarampo estirpe Loss. O protocolo testado para detecção e amplificação de fragmentos dos três segmentos simultaneamente, foi seleccionado como apresentando maior sensibilidade na detecção, e permitindo a obtenção de maior diversidade de informação genómica para caracterização filogenética de vírus. Com excepção da temperatura de annealing, optimizada para 50ºC na reacção de nested-PCR, todos os componentes dos meios reaccionais e ciclos de incubação para as reacções de PCR e nested-PCR, foram mantidos de acordo com o descrito no protocolo inicialmente testado. A sua aplicação permitiu a amplificação dos fragmentos desejados em quantidade suficiente para a sua sequenciação, directamente do RNA viral extraído.

ABSTRACT

Three experimental protocols were tested for the detection and amplification, by the Polymerase Chain Reaction, of genomic fragments from the segments coding for the Heamagglutinin (H), the Nucleocapsid (N) and the Matrix (M) proteins of the measles virus Loss strain genome. The protocol tested for the simultaneous detection and amplification of genomic fragments from the three segments, was selected for presenting the highest sensitivity in detection, and for providing more diverse genomic information for the filogenetic characterization of the virus. Except for the annealing temperature, optimized for 50ºC for the nested-PCR reaction, al reaction mix components and incubation cycles for the PCR and nested-PCR reactions, were maintained according to those described in the initially tested protocol. This permitted the amplification of the desired fragments, in sufficient amount for sequencing directly from the extracted viral RNA.

INTRODUÇÃO

Os casos notificados de infecção por vírus do sarampo, a nível mundial, sofreram um decréscimo acentuado com o desenvolvimento e introdução da vacinação, nos anos sessenta. No entanto, o sarampo permanece ainda responsável por cerca de 900 mil mortes anuais, num total de 30 milhões de novos casos, constituindo a mais mortal doença de infância prevenível por vacinação[1,2,3,4]. Está actualmente implementado um Plano Estratégico Global com vista ao controlo e eliminação da transmissão do vírus do sarampo, desenvolvido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em cooperação com o Centro de Prevenção e Controlo de Doenças dos Estados Unidos (CDC), Organização de Saúde Pan-Americana (PAHO) e Organização de Fundos para Crianças das Nações Unidas (UNICEF)[1,2,3,4]. O plano prevê: (1) uma fase de controlo da doença, por redução da sua incidência e mortalidade através da vacinação; (2) uma fase de prevenção de surtos, por implementação de sistemas de vigilância que incluam o diagnóstico rápido da infecção e a condução de estudos epidemiológicos e; (3) uma fase de eliminação da transmissão do vírus. O sucesso, à data, dos seus objectivos específicos poderá conduzir à tentativa de erradicação mundial do sarampo[1,2,3,4].

Este trabalho experimental teve como objectivo a optimização de um protocolo de Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) para o diagnóstico de infecção por vírus do sarampo, passível de ser adoptado como método de diagnóstico laboratorial inserido no sistema de vigilância e permitindo a condução de estudos epidemiológicos da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

Constituição de pool do vírus do sarampo

Foi constituída uma pool de vírus do sarampo de título 10 3,5 TCID50 /50ml inoculo, por inoculação de uma estirpe de referência Loss em células Vero.

Extracção de RNA viral

O RNA viral foi extraído segundo o método de Boom et al5, alterado, utilizando partículas de sílica. A 150ml de amostra foram adicionados 750ml de tampão de lise (L6) tiocianato de guanidina (GuSCN). A mistura foi agitada 5 segundos no vortex, após o que lhe foram adicionados 40ml de solução de sílica (Sigma) e de novo agitada 5 segundos no vortex.

Após 10 minutos à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada (Eppendorf 5417C) a 18000xg durante 35segundos. O pellet resultante foi lavado duas vezes com tampão de lavagem contendo GuSCN (L2), duas vezes com etanol 70% (Merck) e uma vez com solução de acetona comercial (Merck). O pellet resultante foi seco a 56ºC (Techne Dri-block DB3) durante 10 minutos com tampa aberta, após o que o RNA foi eluído por resuspensão do pellet em 60ml de H2O sem nucleases (Promega) contendo 1ml de RNA-sin (Promega), permanecendo a mistura o.n. a 4ºC. A mistura foi agitada no vortex, incubada a 56ºC (Techne Dri-block DB3) durante 10 minutos, centrifugada (Eppendorf 5417C) a 20800xg durante 4 minutos e o sobrenadante recolhido. O pellet resultante foi, de novo, centrifugado (Eppendorf 5417C) a 20800xg durante 2 minutos, e o sobrenadante recolhido e adicionado ao anterior. A combinação dos sobrenadantes recolhidos foi utilizada directamente na síntese de cDNA.

Síntese de cDNA

40ml da solução de RNA extraído foram adicionados a 60ml de mistura contendo 10ml de tampão PCR 10x (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl) (Life Technologies), 3ml de MgCl2 (50mM) (Life Technologies), 2ml de dNTP (10mM) (Boehringer), 2ml M-MLV Rtase (200U/ml) (Life Technologies), 1ml de Random Hexamers (50U/2,5ml) (Amersham Pharmacia Biotech), 1ml RNAsin (40U/ml) (Promega) e 41ml H2O sem nucleases (Promega). A mistura de reacção foi incubada (BIORAD e-cycler) à temperatura ambiente durante 10 minutos, seguida de 37ºC durante 45 minutos, 95ºC durante 5 minutos e colocada em gelo durante 3 minutos. O cDNA sintetizado foi armazenado a -32ºC até à sua utilização na reacção de PCR.

Detecção e amplificação por PCR

Foram testados 3 protocolos para a reacção de PCR seguida de nested-PCR, diferindo na concentração dos componentes da mistura reaccional, tempos e temperaturas dos ciclos de incubação e no número de ciclos aplicados. Os mesmos pares de primers, para a amplificação do cDNA sintetizado, foram utilizados nos três protocolos, separadamente ou em conjunto, para a amplificação de fragmentos dos segmentos codificantes para as proteínas H (hemaglutinina), N (nucleocápside) e M (matriz) (Quadro I).

Protocolo 1 (protocolo não publicado)
Protocolo para amplificação de um fragmento do segmento H

A 20ml do produto de síntese de cDNA foram adicionados 30ml de mistura reaccional para reacção de PCR contendo 5ml tampão PCR 10x (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl) (Life Technologies), 1,5ml MgCl2 (50mM) (Life Technologies), 1ml cada primer Mh1, Mh2R (10 pmol/ml) (Cruachem), 0,4ml Taq polimerase (5U/ml) (Life Technologies), 1ml dNTPs (10mM) (Boehringer) e 20,1ml H2O sem nucleases (Promega). Os períodos de incubação (BIORAD e-cycler) aplicados foram de 95ºC durante 2 minutos, seguidos de 25 ciclos de 94ºC durante 1 minuto, 50ºC durante 4 minutos e 72ºC durante 1 minuto.

A 10ml do produto da reacção de PCR foram adicionados 40ml de mistura reaccional para reacção de nested-PCR contendo 5ml tampão PCR 10x (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl) (Life Technologies), 1,5ml MgCl2 (50mM) (Life Technologies), 1ml cada primer Mh3, Mh4R (25 pmol/ml) (Cruachem), 1,8ml Taq polimerase (5U/ml) (Life Technologies), 1ml dNTPs (10mM) (Boehringer) e 28,7ml H2O sem nucleases (Promega). Os períodos de incubação (BIORAD e-cycler) aplicados foram de 95ºC durante 2 minutos, seguidos de 25 ciclos de 94ºC durante 1 minuto, 55ºC durante 1 minuto e 72ºC durante 1 minuto.

O produto da reacção de nested-PCR foi detectado por electroforese em gel de Agarose (GTGSeakem) 2% em TBE 1x (Promega), com marcador 1Kb DNA (Life Technologies).

Protocolo 2 (protocolo não publicado)
Protocolo para amplificação de fragmentos dos segmentos H e N

A 20ml do produto de síntese de cDNA foram adicionados 30ml de mistura reaccional para reacção de PCR, preparada para um volume final de 40ml contendo 5ml tampão PCR 10x (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl) (Life Technologies), 1,5ml MgCl2 (50mM) (Life Technologies), 1ml cada primer Mh1, Mh2R, Mn1, Mn2R (10 pmol/ml) (Cruachem), 0,125ml Taq polimerase (5U/ml) (Life Technologies), 1ml dNTPs (10mM) (Boehringer) e 28,375ml H2O sem nucleases (Promega). Os períodos de incubação (BIORAD e-cycler) aplicados foram de 95ºC durante 2 minutos, seguidos de 25 ciclos de 95ºC durante 1minuto, 50ºC durante 2 minutos e 65ºC durante 3 minutos.

A 10ml do produto da reacção de PCR foram adicionados 40ml de mistura reaccional para reacção de nested-PCR contendo 5ml tampão PCR 10x (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl) (Life Technologies), 1,5ml MgCl2 (50mM) (Life Technologies), 1ml cada primer Mh3, Mh4R, Mn3, Mn4R (25 pmol/ml) (Cruachem), 0,125ml Taq polimerase (5U/ml) (Life Technologies), 1ml dNTPs (10mM) (Boehringer) e 28,375ml H2O sem nucleases (Promega). Os períodos de incubação (BIORAD e-cycler) aplicados foram de 95ºC durante 2 minutos, seguidos de 25 ciclos de 95ºC durante 1 minuto, 50ºC durante 2 minutos e 65ºC durante 3 minutos.

O produto da reacção de nested-PCR foi detectado por electroforese em gel de Agarose (GTGSeakem) 2% em TBE 1x (Promega), com marcador 1Kb DNA (Life Technologies).

Protocolo 3
Protocolo para amplificação de fragmentos dos segmentos H, N e M[7,8,9]

A 20ml do produto de síntese de cDNA foram adicionados 30ml de mistura reaccional para reacção de PCR contendo 3ml tampão PCR 10x (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl) (Life Technologies), 0,9ml MgCl2 (50mM) (Life Technologies), 1ml cada primer Mh1, Mh2R, Mn1, Mn2R, Mm1, Mm2R (5 pmol/ml) (Cruachem), 0,2ml Taq polimerase (5U/ml) (Life Technologies), e 19,9ml H2O sem nucleases (Promega). Os períodos de incubação (BIORAD e-cycler) aplicados foram de 95ºC durante 2 minutos, seguidos de 25 ciclos

de 94ºC durante 1minuto, 50ºC durante 1 minuto e 72ºC durante 1 minuto.
A 3ml do produto da reacção de PCR foram adicionados 47ml de mistura reaccional para reacção de nested-PCR contendo 5ml tampão PCR 10x (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl) (Life Technologies), 1,5ml MgCl2 (50mM) (Life Technologies), 1ml cada primer Mh3, Mh4R, Mn3, Mn4R, Mm3, Mm4R (25 pmol/ml) (Cruachem), 0,2ml Taq polimerase (5U/ml) (Life Technologies), 1ml dNTPs (10mM) (Boehringer) e 33,3ml H2O sem nucleases (Promega). Os períodos de incubação (BIORAD e-cycler) aplicados foram de 95ºC durante 2 minutos, seguidos de 25 ciclos de 94ºC durante 1minuto, 55ºC durante 1 minuto e 72ºC durante 1 minuto.
O produto da reacção de nested-PCR foi detectado por electroforese em gel de Agarose (GTGSeakem) 3% em TAE 1x (Life Technologies), com marcador 1Kb DNA (Life Technologies).

Purificação do produto da reacção de nested-PCR

Os fragmentos de DNA foram cortados do gel de agarose e purificados utilizando o kit QIAGENII (QIAGEN), de acordo com as instruções do fornecedor.
Sequenciação do produto da reacção de nested-PCR
Os fragmentos genómicos purificados foram sequenciados (ABIPrism 377 DNA Sequencer; ABIPrism 3100 Genetic Analyser) utilizando o Kit Big Dye-Terminator Applied Biosystems), por utilização individual dos primers descritos para a reacção de nested-PCR.

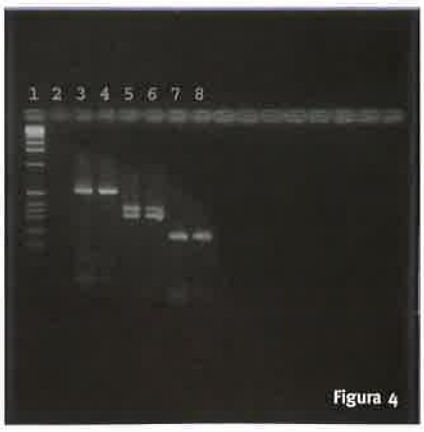


Figura 4

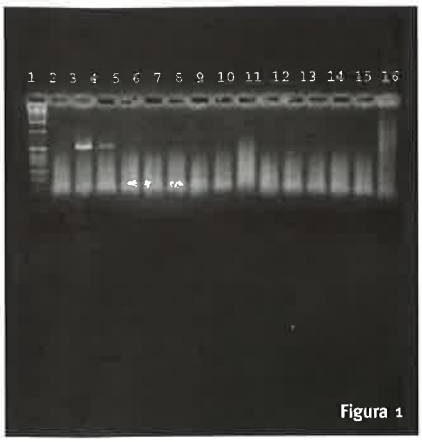


Figura 1

RESULTADOS

Sensibilidade dos protocolos de PCR testados

A sensibilidade na detecção do genoma do vírus do sarampo presente em células infectadas é de elevada importância, essencialmente na aplicação da reacção de PCR ao diagnóstico, de forma a garantir a obtenção de resultados seguros e fiáveis em presença de reduzidas concentrações de genoma viral em amostras biológicas[7].
A sensibilidade dos protocolos utilizados foi avaliada pela ocorrência de amplificação de fragmentos genómicos do vírus do sarampo, em diluições seriadas da pool utilizada.
A aplicação do protocolo-1 permitiu a detecção e amplificação do fragmento de 552pb do segmento H até a um limite de 316 TCID50 (Figura 1).
A aplicação do protocolo-2 permitiu a detecção e amplificação dos fragmentos de 552pb e 317pb dos segmento H e N, respectivamente, até um limite de 316 TCID50. A presença da banda 3 reflectiu a amplificação não-específica de um fragmento de aproximadamente 357pb do genoma viral (Figura 2).
A aplicação do protocolo-3 permitiu a detecção e amplificação do fragmento de 187pb do segmento M até um limite de 0,316 TCID50, e dos fragmentos de 552pb e 317pb dos segmentos H e N, respectivamente, até um limite de 31,6 TCID50, tendo sido este protocolo seleccionado como apresentando maior sensibilidade na detecção de genoma viral. A presença da banda 4 reflectiu, novamente, a amplificação não específica do fragmento de cerca de 357pb do genoma viral (Figura 3).



Figura 2

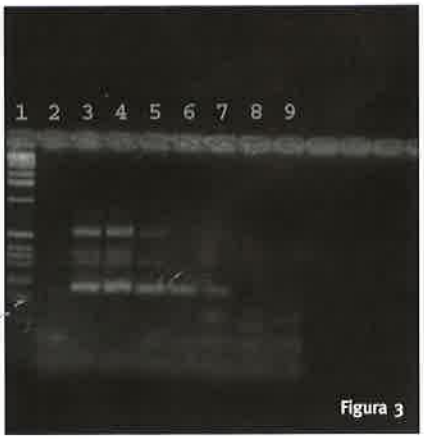


Figura 3

Confirmação do segmento para o qual ocorre amplificação não-específica de um fragmento

A aplicação do protocolo-3, por adição individual dos primers para amplificação dos três fragmentos permitiu a confirmação do fragmento de 357pb de amplificação não-específica como pertencente ao segmento N do genoma viral (Figura 4).

Optimização de parâmetros do protocolo-3: tentativa de eliminação da amplificação não-específica

Foram conduzidas reacções de PCR e nested-PCR com aplicação de uma gama de temperaturas de annealing de 45 - 60ºC, na tentativa da sua optimização. Esta reflectiu a tentativa de eliminação da amplificação do produto não-específico e, de obtenção de uma maior quantidade de produto específico amplificado

individualmente pelos três pares de primers utilizados. Foram aplicadas as temperaturas de annealing de 50ºC e 60ºC a misturas reaccionais preparadas de acordo com o protocolo-3, relativamente à reacção de PCR, mantendo os restantes parâmetros da reacção de PCR e nested-PCR de acordo com os estabelecidos no protocolo utilizado. O resultado da variação da temperatura de annealing na reacção de PCR não revelou qualquer alteração relativamente ao obtido por aplicação da temperatura de annealing 50ºC estabelecida no protocolo-3 utilizado, pelo que o seu valor foi mantido inalterado (resultado não apresentado).

Foram aplicadas as temperaturas de annealing de 45ºC, 50ºC, 55ºC e 60ºC ao meio reaccional preparado de acordo com o protocolo-3 relativamente à reacção de nested-PCR, mantendo os restantes parâmetros da reacção de nested-PCR e PCR de acordo com os estabelecidos no protocolo utilizado, não tendo sido possível a eliminação da amplificação não-específica. Relativamente à quantidade de produto final amplificado, a aplicação de uma temperatura de annealing de 50ºC confere claramente um maior rendimento à reacção, sendo alterada para este valor a temperatura de annealing a aplicar na reacção de nested-PCR pelo protocolo-3 descrito (Figura 5).



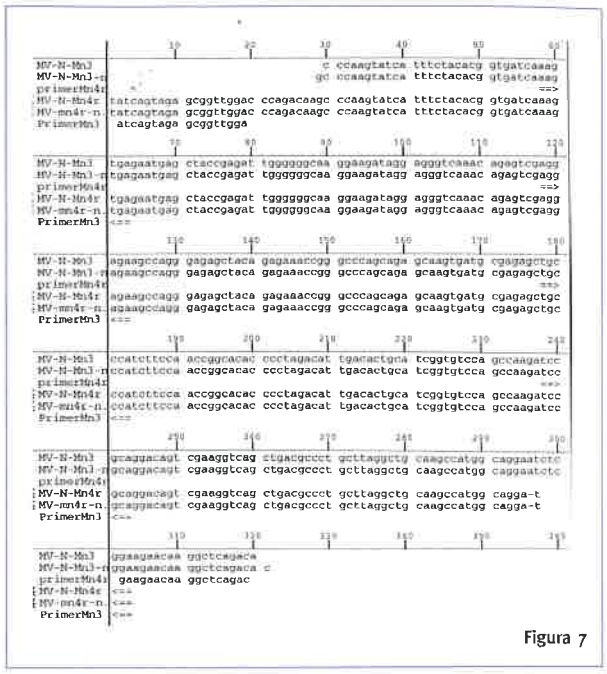
Figura 5



Figura 6

Foi conduzida uma reacção de PCR e nested-PCR de acordo com o protocolo-3 alterado, para a optimização da concentração dos primers utilizados para amplificação do fragmento do segmento N, na tentativa de eliminar ou minimizar a amplificação de produto não-específico e de maximizar o seu rendimento em produto final. O efeito da redução na concentração dos primers foi testado conjuntamente para a reacção de PCR e nested-PCR, de acordo com o procedimento indicado no quadro II.

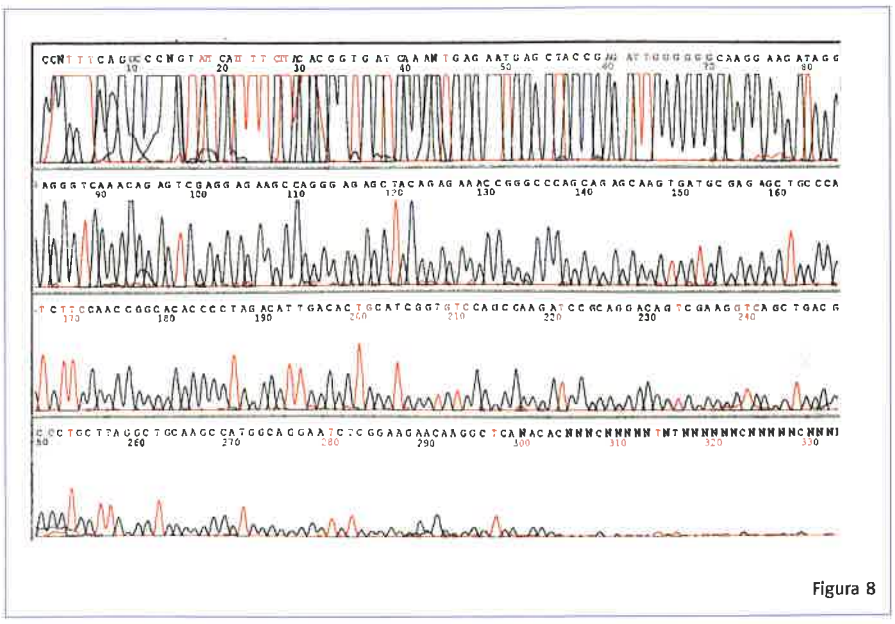
A redução na concentração dos primers no meio reaccional da reacção de PCR e nested-PCR, individualmente ou em conjunto, não teve, aparentemente, qualquer efeito na tentativa de eliminação da formação de produto não-específico ou no rendimento em produto final amplificado, sendo as sua concentrações inicialmente descritas mantidas inalteradas (Figura 6).


Figura 7

Determinação da origem da amplificação não-específica do fragmento do segmento N

O alinhamento entre a sequência de bases dos fragmentos amplificados específica e não-especificamente do segmento N revelou tratar-se da mesma sequência (Figura 7).

O electroferograma obtido por sequenciação do fragmento de amplificação não-específica do segmento N, utilizando o primer Mn3, permitiu verificar a existência de uma continuação na leitura de ba-


Figura 8

ses após o local de annealing específico do primer Mn4R (Figura 8).
O alinhamento entre a sequência de bases do fragmento de amplificação não-específica do segmento N, o primer Mn4R e a sequência do segmento N da estirpe Edmonston utilizada como referência no desenho dos primers, permitiu detectar nesta uma região com algum nível de homologia com a sequência de bases do primer Mn4R, a 3´ do seu local de annealing específico (Figura 9).

DISCUSSÃO

A importância da aplicação prática de um protocolo de PCR para diagnóstico de infecção por vírus do sarampo, possibilitando o seu estudo genómico directamente de amostras biológicas, é conferida pela selecção de segmentos a amplificar e pela sensibilidade e especificidade da sua detecção.
A avaliação comparativa dos três protocolos testados permitiu a selecção do protocolo 3 para optimização e implementação como metodologia de referência, com base na selecção de segmentos a amplificar (segmentos H, N e M) e sensibilidade na sua detecção. A amplificação do segmento H do genoma viral, codificante para a proteína hemaglutinina, é de extrema importância na análise genómica por esta constituir o alvo maioritário de reconhecimento por anticorpos. O segmento N, codificante para a proteína nucleocápside, apresenta o maior nível de variabilidade do genoma, sendo a sua análise genómica de elevada importância na caracterização filogenética dos vírus isolados e o segmento M, codificante para a proteína matriz, é altamente conservado comparativamente com os restantes segmentos genómicos conferindo um elevado nível de segurança ao diagnóstico[7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22]. Esta amplificação simultânea garante a obtenção de um conjunto de informação que permite um estudo genómico mais completo e aprofundado e ainda uma elevada especificidade na detecção do genoma viral que, embora não avaliada neste trabalho experimental, se encontra bem documentada[19].

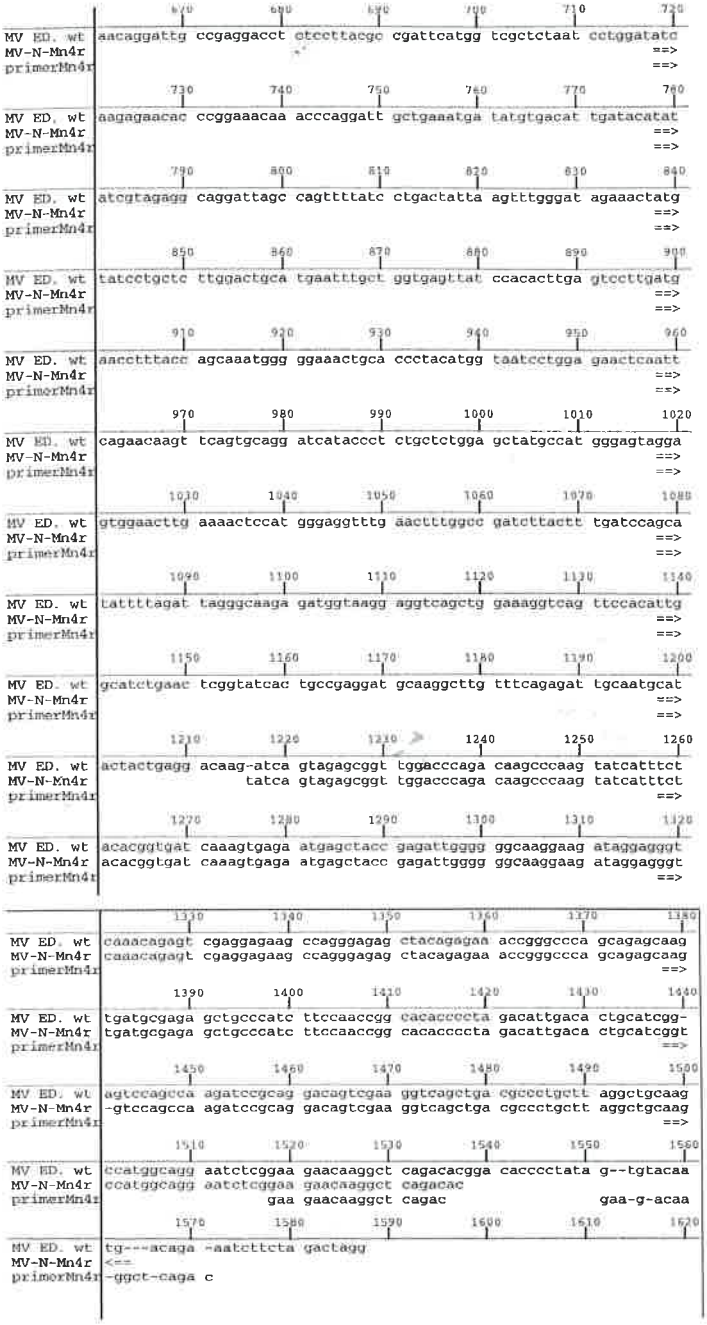


Figura 9

Relativamente à sensibilidade na detecção de genoma viral, a comparação entre os resultados obtidos pelos três protocolos utilizados para a amplificação do segmento H e protocolos 2 e 3 para a amplificação do segmento N, permite seleccionar o protocolo 3 como sendo igualmente o mais sensível.
Este foi, consequentemente, testado e analisado de forma a garantir a sua optimização e funcionalidade como metodologia de referência no diagnóstico e análise genómica viral. A análise dos resultados obtidos pela sua aplicação permitiu verificar a ocorrência de uma sensibilidade mais elevada na detecção e amplificação do segmento M, comparativamente com os restantes segmentos amplificados. Esta discrepância pode dever-se ao facto de este constituir a região mais conservada do genoma viral, podendo, como tal, ser reconhecido pelos

primers utilizados mesmo em presença de estirpes filogeneticamente afastadas e consequentemente apresentando diferenças ao nível da sua sequência de bases (como a estirpe Edmonston utilizada como referência no desenho dos primers e a estirpe Loss utilizada como controlo positivo para testar a aplicação do protocolo). A localização do segmento M próxima do terminal 5´ do genoma viral pode igualmente contribuir para esta ocorrência, uma vez que a transcrição ocorre segundo um gradiente de 5´ para 3´, resultando numa maior acumulação de RNA viral dos segmentos localizados próximo do terminal 5´[11].

Por aplicação do protocolo 3, verifica-se, no entanto, a amplificação de um fragmento não-específico do segmento N. Esta não terá qualquer efeito na capacidade de diagnóstico de infecção por vírus do sarampo, por ser igualmente indicadora da presença de genoma viral, embora o rendimento de amplificação do produto específico do segmento N sofra uma redução por ocorrer competição pelo annealing dos primers disponíveis no meio reaccional. A obtenção de uma menor quantidade de produto específico amplificado reflecte, consequentemente, uma menor disponibilidade de produto para sequenciação e caracterização filogenética obtido directamente das reacções de amplificação. Este factor não se apresentou, no entanto, limitativo à aplicação do protocolo 3 com vista à análise genómica viral, tendo sido obtido produto amplificado, após purificação, em quantidade suficiente à condução da reacção de sequenciação dos fragmentos desejados, directamente do RNA viral extraído.

A análise do alinhamento entre o fragmento de amplificação específica, a estirpe de referência Edmonston e o primer Mn4R, permitem sugerir que a formação de produto não-específico ocorra por annealing não-específico do primer Mn4R a um local a 3´do seu local de annealing específico. O fragmento amplificado não-especificamente seria 33 bases superior em tamanho relativamente ao fragmento de amplificação específica, encontrando-se este valor muito aproximado ao obtido por determinação do seu tamanho em pb directamente de fotografias de gel de agarose obtidas (resultado não apresentado). Não tendo sido possível a sua eliminação por optimização da temperatura de annealing e concentração de primers a aplicar, parâmetros condicionantes da sua ocorrência, sugere-se o desenho de novos primers, complementares a regiões únicas do genoma viral, para amplificação de um diferente fragmento do segmento N.

Pode concluir-se que o protocolo 3 permitiu a detecção e amplificação de fragmentos do genoma viral com elevada sensibilidade, tendo ainda sido obtido produto amplificado em quantidade necessária à sua análise genómica. A utilização do protocolo 3 como metodologia de referência no diagnóstico de infecção por vírus do sarampo pode, consequentemente, ser inserida no sistema de vigilância implementado na fase de prevenção de surtos, referida anteriormente e prevista pelo Plano Estratégico Global com vista à eliminação da transmissão do vírus. Deve, no entanto, ser garantida a disponibilidade de amostras biológicas, de acordo com a sua natureza e período de colheita específicos, de pacientes com suspeita de infecção por vírus do sarampo de forma a garantir a fiabilidade do diagnóstico baseado em pesquisa de genoma viral.

Quadro I
Descrição das características dos primers utilizados pelos protocolos de PCR testados

Primer[a]	Sentido	Posição[b] (nt)	Sequência (5´-3´)	Produto Amplificado	Temp. Melting[c]	Temp. Annealing[d]
Gene Hemaglutinina						
Mh1	(+)	7844-7864	ACTACAATCAGAGGTCAATTC	570	58ºC	53-55ºC
Mh2R	(-)	8394-8414	AGCATGTCTCCATTCGCAACT		62ºC	57-59ºC
Mh3	(+)	7852-7871	CAGAGGTCAATTCTCAAACA	552	56ºC	51-53ºC
Mh4R	(-)	8385-8404	CATTCGCAACTTGTCATCTG		58ºC	53-55ºC
Gene Nucleocápside						
Mn1	(+)	1304-1323	TGCATACTACTGAGGACAA	390	54ºC	49-51ºC
Mn2R	(-)	1694-1676	TCTCGCACCTAGTCTAGAA		56ºC	51-53ºC
Mn3	(+	1324-1341	ATCAGTAGAGCGGTTGGA	317	54ºC	49-51ºC
Mn4R	(-)	1641-1624	GTCTGAGCCTTGTTCTTC		54ºC	49-51ºC
Gene Matriz						
Mm1	(+)	3541-3560	TCAGAGTCATAGATCCTGGT	200	58ºC	53-55ºC
Mm2R	(-)	3740-3721	AACAACTATGTCAAGCTCAG		56ºC	51-53ºC
Mm3	(+)	3549-3560	ATAGATCCTGGTCTAGGC	187	54ºC	49-51ºC
Mm4R	(-)	3736-3719	ACTATGTCATGCTCAGTG		52ºC	47-49ºC

(a)Os primers Mh3, Mh4R, Mn3, Mn4R, Mm3 e Mm4R (Cruachem) foram igualmente utilizados nas reacções de sequenciação.
(b)A posição (nt) é referente à estirpe de Edmonston (GeneBank, numero de acesso 16565)
(c)(d)A temperatura de melting dos primers foi determinada com base na fórmula Tm = (A+T) x 2ºC + (G+C) x 4ºC. A temperatura de annealing foi considerada 3-5ºC abaixo da temperatura de melting determinada 6.

Quadro II
Concentração de primers a utilizar nas reacções de amplificação do protocolo-3s

Tubo	A	B
1	5	25
2	5	15
3	3	25
4	3	15

A ~ Concentração final de primers adicionados à mistura reaccional para a reacção de PCR. (pmol/ml)

B ~ Concentração final de primers adicionados à mistura reaccional para a reacção de nested-PCR. (pmol/ml)

LEGENDAS

Legenda da figura 1:
poço 1: marcador (1kb DNA); poço 2: controlo negativo (meio de células); poço 3: pool de vírus do sarampo; poço 4 - 16: diluições seriadas de 10-1 a 10-13 da pool de vírus do sarampo. A banda visível corresponde ao amplicão de 552pb, do gene H.

Legenda da figura 2
poço 1: controlo negativo (meio de células); poço 2: pool de vírus do sarampo; poço 3 - 10: diluições seriadas de 10-1 a 10-8 da pool de vírus do sarampo; poço 11: marcador (1kb DNA). As bandas visíveis correspondem, no sentido dos poços à base do gel, ao amplicão de 552pb do gene H, com reduzida nitidez à amplificação não-específica de um fragmento do genoma viral e ao amplicão de 317pb do gene N, respectivamente.

Legenda da figura 3
poço 1: marcador (1kb DNA); poço 2: controlo negativo (meio de células); poço 3: pool de vírus do sarampo; poço 4 - 9: diluições seriadas de 10-1 a 10-6 da pool de vírus do sarampo. As bandas visíveis correspondem, no sentido dos poços à base do gel, aos amplicões de 552pb do gene H, amplificação não-específica do um fragmento do genoma viral, amplicão de 317pb do gene N e de 187pb do gene M, respectivamente.

Legenda da figura 4
poço 1: marcador (1kb DNA); poço 2: controlo negativo (meio de células); poço 3, 4: meio reaccional contendo primers para amplificação do fragmento do segmento H; poço 5, 6: meio reaccional contendo primers para amplificação do fragmento do segmento N; poço 7, 8: meio reaccional contendo primers para amplificação do fragmento do segmento M. As bandas visíveis representam nos poços 3 e 4 o amplicão de 552pb do gene H, nos poços 5 e 6 a amplificação não-específica do fragmento de 357pb do genoma viral e amplicão de 317pb do gene N e nos poços 7 e 8 o amplicão de 187pb do gene M, respectivamente.

Legenda da figura 5
poço 1: marcador (1kb DNA); poço 2: controlo negativo (meio de células); poço 3 a 6: aplicação da temperatura de annealing de 45ºC, 50ºC, 55ºC e 60ºC, respectivamente, nos ciclos térmicos da reacção de nested-PCR. As bandas visíveis representam, no sentido dos poços à base do gel, o amplicão de 552pb do gene H, amplificação não-específica do fragmento de 357pb do genoma viral, amplicão de 317pb do gene N e de 187pb do gene M, respectivamente

Legenda da figura 6
poço 1: marcador (1kb DNA); poço 2: controlo negativo (meio de células); poço 3 a 6: produto da reacção de nested-PCR contido nos tubos 1 a 4, respectivamente. As bandas visíveis representam, no sentido dos poços à base do gel, o amplicão de 552pb do gene H, amplificação não-específica do fragmento de 357pb, amplicão de 317pb do gene N e de 187pb do gene M, respectivamente.

Legenda da figura 7
Alinhamento entre a sequência de bases dos fragmentos do segmento N amplificados especifica- e não-especificamente.

Legenda da figura 8
Electroferograma obtido por sequenciação do fragmento de amplificação não-específica do segmento N, utilizando o primer Mn3.

Legenda da figura 9
Alinhamento entre a sequência de bases do fragmento de amplificação não-específica do segmento N, a sequência de bases do segmento N da estirpe Edmonston e a sequência do primer Mn4R. A designação MV ED. Wt corresponde à sequência de bases do segmento N do genoma viral da estirpe de referência Edmonston, a designação MV-N-Mn4R corresponde à sequência de bases do segmento N da estirpe Loss obtida por utilização do primer Mn4R e a designação primer Mn4R corresponde à sequência de bases do primer Mn4R.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) Doc. Organização Mundial de Saúde (1998) - Measles.
(2) Doc. Organização Mundial de Saúde (1998) - Advances in Global Measles Control and Elimination : Summary of the 1997 International Meeting.
(3) Doc. Organização Mundial de Saúde (2001) - Press Release : U.N. launch new plan to halve mortality of measles, a major childhood killer.
(4) Doc. Organização Mundial de Saúde (1999) - WHO Guidelines for Epidemic Preparedness and Response to Measles Outbreaks.
(5) Boom, R; Sol, CJA; Salimans, MMM; Jansen, CL; Wertheim Van Dillen, PME; Van Der Noordaa, J - Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology, 1990; Mar: 495-503.
(6) Newton, CR - PCR essential data. John Wiley and Sons.
(7) L, Jin; Richards, A; Brown, DWG - Development of a dual target PCR for detection and characterization of measles virus in clinical samples. Molecular and Cellular Probes, 1996; 10: 191-200.
(8) L, Jin; Sun, YJ; GE, L; Brown, DWG - Characterization of of a new genotype of measles virus in China and England. Epidemiol. Infect., 1998; 121: 691-697.
(9) L, Jin; Brown, DWG; Ramsey, MEB; Rota, PA; Bellini, WJ - The diversity of measles virus in the United Kingdom. Journal of General Virology, 1997; 78: 1287-1294.
(10) Norrby, AB; Oxman, MN - Measles Virus. Virology 2ª Ed. Raven Press New York. Cap 27.
(11) Orvel, C - Measles Virus. Encyclopaedia of Virology, 5ª Ed. Academic Press, Cap 22.
(12) Rota, PA; Bellini, JS - Molecular epidemiology of measles virus. Seminars in Virology, 1995. 6: 379-386.
(13) L., Jin; Knowles, WA; Rota, PA; Bellini, WJ; Brown, DWG - Genetic and antigenic characterization of the heamagglutinin protein of measles virus strains recently circulating in the UK. Virus Research, 1999; 55: 107-113.
(14) Chadwich, N; Bruce, I; Davies, M; Gemen, B; Schukkink, R; Khan, K; Pounder, R; Wakefield, A - A sensitive and robust method for measles RNA detection. Journal of Virological Methods, 1998; 70: 59-70.
(15) Vardas, E; Kreis, S - Isolation of measles virus from a naturally-immune asymptomatically re-infected individual. Journal of Clinical Virology, 1999; 13: 173-179.
(16) R., Ray; Cooper, PJ; Earl, P; Dhillon, AP; Pounder, RE; Wakefield, AJ - Direct in situ reverse transcriptase polymerase chain reaction for the detection of measles virus. Journal of Virological Methods, 1996; 60: 1-17.
(17) Birkun, A; Kuiken, T; Haines, DM; Osterhaus, ADME; Van de Bildt, MWG; Joiris, CR; Siebert, U - Epizootic of morbilliviral disease in common dolphins (Delphinus delphis ponticus) from the black sea. Veterinary Record, 1999; Jan: 85-92.
(18) Bilkis, MD; Barrero, PR; Mistchenko, AS - Measles Resurgence in Argentina: 1997-8 Outbreak. Epidemiol. Infect., 2000; 124: 289-293.
(19) Kawashima, H; Mori, T; Kashiwagi, Y; Takekuma, K; Hoshika, A; Wakefield, A - Detection and Sequencing of measles virus from peripheral mononuclear cells from patients with Inflammatory Bowel Disease and Autism. Digestive Disease and Science, 2000; 45,4: 723-729.
(20) Barrero, PR; Wolff, CD; Passeggi, CA; Mistchenko, AS - Sequence analysis of measles virus heamagglutinin isolated in Argentina during the 1997-1998 outbreak. Journal of Medical Virology, 2000; 60: 91-96.
(21) Mubarak, S; Van de Bildt, MWG; Mustafa, OA; Vos, HW; Mukhtar, MM; Groen, J; Hassan, AM; Niesters, HGM; Ibrahim, SA; Zijlstra, EE; Wild, TF; Osterhaus, ADME; Swart, RL - Serological and virological characterization of clinically diagnosed cases of measles in suburban Khartoum. Journal of Clinical Microbiology, 2000; Mar: 987-991.
(22) Shimizu, H; McCarthy, CA; Smaron, MF; Burns, JC - Polymerase chain reaction for the detection of measles virus in clinical samples. Journal of Clinical Microbiology, 1993; Maio: 1034-1039.