



NORMA TÉCNICA

L5.518

Mai/1993
27 PÁGINAS

Poliovirus - detecção da reação em cadeia de polimerase (PCR) em amostras ambientais: método de ensaio

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

[http: // www . cetesb . sp . gov . br](http://www.cetesb.sp.gov.br)

CETESB

**POLIOVÍRUS: DETECÇÃO ATRAVÉS DA REACÇÃO
EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)
EM AMOSTRAS AMBIENTAIS**

L5.518

MAIO/93

Método de ensaio

SUMÁRIO

Pág.

Introdução	1
1 Objetivo	2
2 Normas complementares	2
3 Definições	2
4 Aparelhagem	2
5 Execução do ensaio	15
6 Resultados	22
Anexo A Recomendações de ordem geral	23
Anexo B Referências bibliográficas	26

INTRODUÇÃO

Os métodos de concentração e ensaio viral, utilizados para evidenciar os vírus entéricos presentes em amostras ambientais vem sendo desenvolvidos e aperfeiçoados nos últimos anos.

Entre os vírus presentes em amostras ambientais os mais frequentemente isolados são os poliovírus, os vírus Coxsackie A e B, os vírus ECHO, que fazem parte do grupo dos Enterovírus. Em relação aos poliovírus selvagens, embora as metodologias convencionais de isolamento e identificação empregando culturas celulares tenham se revelado eficientes para a sua evidenciação nas amostras de águas, a grande redução da circulação desses vírus, impõe a necessidade da utilização de métodos cada vez mais sensíveis para determinar a sua ocorrência no meio ambiente.

Os recentes progressos ocorridos no campo da virologia molecular tem contribuído significativamente para a implantação de metodologias bastante sensíveis, rápidas e de custo relativamente baixo. A nova técnica de amplificação de DNA, a reação em cadeia de polimerase (PCR), representa um dos maiores avanços da biologia molecular. Esta técnica permite a amplificação específica de fragmentos de material genético que estão inicialmente presentes na amostra, mesmo em quantidades de picogramas, em poucas horas.

A aplicação direta da técnica "PCR" em concentrados de amostras de água, obtidos através de métodos de concentração tradicionais, pode fornecer um novo e eficaz instrumento para programas de monitoramento de vírus no meio ambiente.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve os procedimentos que permitem detectar intratipicamente poliovírus em amostras ambientais utilizando-se a técnica de reação em cadeia de polimerase.

2 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

M1.002 - Lavagem, preparo e esterilização de material para cultura celular

L5.505 - Enterovírus - Método de concentração de amostras de água de esgoto por adsorção a hidróxido de alumínio

L5.009 - Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia

L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos

3 DEFINIÇÕES

3.1 DNA

Acido desoxirribonucléico.

3.2 RNA

Acido ribonucléico.

3.3 PCR

Reação em cadeia de polimerase.

3.4 p.a.

Para análise.

3.5 q.s.p.

Quantidade suficiente para.

4 APARELHAGEM

4.1 Materiais e equipamentos

4.1.1 Agitador tipo "Vortex".

4.1.2 Autoclave

Deve ter tamanho suficiente para permitir a circulação do vapor

ao redor do material a ser esterilizado por esse método e ser equipada com válvula de segurança, manômetro e termômetro, cujo bulbo ficará na direção da linha de escape do vapor condensado (dreno). A autoclave deve ser normalmente operada a uma pressão de vapor de 105 KPA e produzir em seu interior, uma temperatura de 121,6 °C, ao nível do mar. Deve-se observar em seu funcionamento, a substituição por vapor de todo o ar existente na câmara. A operação total da autoclave deve durar no máximo uma hora, sendo recomendado o acompanhamento dos ciclos de operação e os registros de tempo-temperatura. É recomendável que a autoclave atinja a temperatura de esterilização de 121 °C em 30 minutos e mantenha essa temperatura durante o período de esterilização.

4.1.3 Balanças

4.1.3.1 Com sensibilidade mínima de 0,1 g ao pesar 150 g.

4.1.3.2 Com sensibilidade mínima de 1 mg ao pesar 10 g.

4.1.4 Banho-maria

Equipado com termostato para temperatura de 35 °C a 60 °C, com capacidade suficiente para comportar recipientes contendo meios de cultura.

4.1.5 Capela de segurança biológica (câmara de fluxo laminar vertical)

Equipamento que possibilita a retenção de partículas do ar através da passagem do mesmo por filtros HEPA, cuja eficiência é de 99,99% para partículas iguais ou maiores a 0,3 µm. O ar estéril produzido é dirigido em forma de fluxo direto sobre a área de trabalho, proporcionando grande segurança nos manuseios que devem ser realizados em condições de máxima esterilidade como também proteção dos operadores.

4.1.6 Congelador

Com regulagem para manter a temperatura na faixa de -20 °C a -70 °C. É destinado ao armazenamento de soluções e dos concentrados das amostras. A limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.1.7 Destilador de água ou aparelho para desionização

Deve produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram na multiplicação celular.

4.1.8 Estufa para esterilização e secagem

A estufa deve acondicionar pipetas, frascos para reagentes e meios de cultura e toda vidraria e aparelhagem que pode ser esterilizada por calor seco, e ter capacidade suficiente para permitir a circulação do ar quente ao redor do material a ser esterilizado. Deve ser equipada com um termômetro e um termostato

e operar normalmente a uma temperatura de 170 a 180 °C. O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de 4 a 6 horas, à temperatura de 170 a 180 °C.

4.1.9 Fonte de pressão

Bomba de vácuo e pressão ou outro dispositivo conveniente para produzir uma pressão de 1,0 kgf/cm .

4.1.10 Frascos com capacidade de 1 000 mL com tampa de rosca para armazenamento de meio de cultura

4.1.11 Mangueiras de borracha

Com parede espessa, resistentes à pressão.

4.1.12 Materiais para preparação de meios de cultura e reagentes

Recipientes de vidro neutro ou aço inoxidável. O material de aquecimento e os bastões devem estar limpos e isentos de qualquer substância tóxica (nunca devem ser de cobre).

4.1.13 Membranas filtrantes

De éster de celulose, com porosidade de 0,22 µm e 0,45 µm e com diâmetro de 142 mm e de nitrocelulose de 0,45 µm com 315 x 640 mm.

4.1.14 Papel de alumínio

4.1.15 Papel filtro

4.1.16 Papel Kraft

4.1.17 Pera de sucção ou pipetador de segurança

4.1.18 Pinça dente de rato

4.1.19 Pinça de pontas retas e bordas lisas

4.1.20 Pincel demarcador

Para escrita em vidro.

4.1.21 Placa agitadora magnética

Com velocidade regulável.

4.1.22 Micropipetador automático

Ou outro dispositivo de segurança para sucção de conteúdos líquidos, com regulagem variável para 1 µL a 1 000 µL.

4.1.23 Pré-filtro de fibra de vidro

Tipo AP-20, com diâmetro de 142 mm.

4.1.24 Pisseta

Para álcool etílico a 70%.

4.1.25 Protocolos

Para registro dos testes.

4.1.26 Provetas graduadas

Com marcação externa, nos volumes de 100, 250, 500, 1 000 e 2 000 mL.

4.1.27 Porta-filtros

De aço inoxidável, diâmetro de 142 mm.

4.1.28 Potenciômetro

Deve ter escala bem legível e medir com precisão mínima de 0,1 unidade de pH. A calibração do potenciômetro deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia, com tampões de pH 4,0; pH 6,86 e pH 9,18.

4.1.29 Refrigerador

Certificado para manter a temperatura na faixa de 2 a 8 °C, com capacidade para comportar recipientes com os meios de cultura e soluções a serem mantidos sob refrigeração. Sua limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.1.30 Vasilhames de pressão

De aço inoxidável, com capacidade para 5 litros.

4.1.31 Alcoômetro**4.1.32 Algodão hidrófilo****4.1.33 Bandejas de aço inoxidável****4.1.34 Braçadeiras**

Tipo rosca sem fim de 1" e 1/2".

4.1.35 Barra magnética

Recoberta com teflon, tamanho 6 cm x 1 cm.

4.1.36 Chaves especiais para porta-filtros**4.1.37 Tubos Eppendorf de 0,5 e 1,5 l****4.1.38 Bico de Bunsen****4.1.39 Etiquetas****4.1.40 Fita crepe**

4.1.41 Fita crepe especial

Para controle do material submetido à esterilização, estufa ou autoclave.

4.1.42 Estantes para tubos Eppendorf**4.1.43 Tripé****4.1.44 Tela de amianto**

De tamanho 22 x 22 cm.

4.1.45 Microcentrífuga para tubos Eppendorf

Com capacidade para 14 000 rpm.

4.1.46 Sacos plásticos não tóxicos**4.1.47 Luvas descartáveis****4.1.48 Ponteiras para micropipetadores****4.1.49 Ultracentrífuga refrigerada**

Com velocidade até 60 000 rpm e que tenha rotores com caçapas para volumes de 20,0 mL e 50,0 mL.

4.1.50 Centrífuga de mesa

Com velocidade até 1 000 rpm e que tenha rotor com caçapas para volumes de 10,0 mL.

4.1.51 Speedvac concentrator (microcentrífuga à vácuo)**4.1.52 Bomba de alto vácuo****4.1.53 DNA Thermal Cycler****4.1.54 Sistema de eletroforese vertical****4.1.55 Fonte de voltagem****4.1.56 Transiluminador de ultra-violeta****4.1.57 Câmera fotográfica Polaroid e acessórios****4.1.58 Filme Polaroid tipo 57****4.2 Soluções****4.2.1 Reagentes**

4.2.1.1 Para o preparo das soluções utilizadas nesse ensaio são os seguintes os reagentes necessários:

- 1) ácido bórico p.a.
- 2) ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) p.a.
- 3) acrilamida p.a.
- 4) álcool isoamílico p.a.
- 5) azul de bromofenol p.a.
- 6) cloreto de lítio (LiCl) p.a.
- 7) cloreto de magnésio (MgCl₂) p.a.
- 8) cloreto de potássio (KCl) p.a.
- 9) cloreto de sódio (NaCl) p.a.
- 10) clorofórmio p.a.
- 11) complexo de vanadil-ribonucleosídeo p.a.
- 12) ditiotreitól p.a.
- 13) fenol p.a.
- 14) N, N' metileno bis-acrilamida p.a.
- 15) nonidet P-40 (NP-40) p.a.
- 16) persulfato de amônia p.a.
- 17) sacarose p.a.
- 18) sefadex G25 p.a.
- 19) sefadex G200 p.a.
- 20) tris - acetate p.a.
- 21) tris - HCl p.a.
- 22) trizma base p.a.
- 23) xylene cyanole FF p.a.
- 24) primers específicos para poliovírus tipos 1,2 e 3 vacinais
- 25) primers específicos para poliovírus tipos 1,2 e 3 virulentos (selvagens)
- 26) brometo de etídeo
- 27) desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPS)
- 28) inibidor de enzima inativadora de RNA
- 29) óleo mineral p.a.
- 30) transcriptase reversa
- 31) taq polimerase

4.2.1.2 Os reagentes devem ser de grau bacteriológico e procedência idônea, apresentar odor, cor e consistência inalterados, ser livres de elementos bactericidas ou bacteriostáticos inespecíficos bem como de carboidratos inespecíficos.

4.2.2 Preparo de soluções

Para tratamento dos concentrados finais das amostras de águas de esgoto.

4.2.2.1 Solução tampão Tris-HCl 10 mM

Componentes	Quantidade (mL)
Solução tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 7,6.....	1,0
Água ultra pura estéril q.s.p.....	100,0
pH final: 7,6	

Preparo:

Dissolver 1 mL da solução tampão Tris-HCl 1,0 M em água ultra pura estéril. Completar o volume final para 100,0 mL.

4.2.2.2 Coluna de Sefadex

No preparo da matriz da coluna de Sefadex devem ser utilizadas quatro soluções preparadas da seguinte forma.

a) Solução A: Solução de Sefadex G25

Componentes	Quantidade
Sefadex G25 (Pharmacia Fine Chemicals).....	15,0 g
Água bidestilada q.s.p.....	150,0 mL

Preparo:

Dissolver 15,0 g de Sefadex G25 em água bidestilada. Completar o volume para 150,0 mL. Esterilizar em autoclave, a 121 °C durante 15 minutos.

b) Solução B: Solução de Sefadex G 200

Componentes	Quantidade
Sefadex G 200 (Pharmacia Fine Chemicals) p.a.....	2,0 g
Água bidestilada q.s.p.....	150,0 mL

Preparo:

Dissolver 2,0 g de Sefadex G 200 em água bidestilada. Completar o volume para 150,0 mL. Esterilizar em autoclave, a 121 °C durante 15 minutos.

c) Solução C: Solução Tampão TSE

A preparação desta solução deve ser realizada como descrita no item 4.2.2.3.

d) Solução D: Água bidestilada

Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos, 1 200,0 mL de água bidestilada.

e) Preparo final da Coluna de Sefadex

Componentes	Quantidade
Solução A: (Sefadex G25).....	150,0 mL
Solução B: (Sefadex G 200).....	150,0 mL
Solução C: (Tampão TSE).....	500,0 mL
Solução D: (Água bidestilada).....	1 200,0 mL

Preparo:

Após esterilizar a solução A e B, deixar esfriar e colocá-las em banho de glicerina a 90°C durante 5 horas. Após esse período, removê-las do banho e limpar os frascos na região exterior. Na câmara de fluxo laminar vertical retirar a parte superior de cada solução com o auxílio de uma pipeta ligada a um sistema de vácuo. Acrescentar o mesmo volume de água bidestilada estéril. Repetir o processo mais 2 vezes com a água bidestilada e 1 vez com solução tampão TSE estéril.

Misturar as soluções A e B, volume/volume, com assepsia. Manter sob refrigeração de 2 a 8°C.

4.2.2.3 Solução Tampão TSE

Na preparação da solução tampão TSE devem ser utilizadas três soluções preparadas da seguinte forma:

a) Solução A: Solução Tampão Tris 1M

Componentes	Quantidade
Trizma base p.a.....	6,05 g
Água bidestilada q.s.p.....	50,0 mL
pH final: 7,6	

Preparo:

Dissolver 6,05 de trizma base em água bidestilada. Completar o volume para 50,0 mL.

b) Solução B: Solução de cloreto de sódio 5M

Componentes	Quantidade
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	14,61 g
Água bidestilada q.s.p.....	50,0 mL

Preparo:

Dissolver 14,61 g de cloreto de sódio em água bidestilada. Completar o volume para 50,0 mL.

c) Solução C: Solução de EDTA 0,2 M

Componentes	Quantidade
Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) p.a.....	3,722 g
Água bidestilada q.s.p.....	50,0 mL

Preparo:

Dissolver 3,722 g de EDTA em água bidestilada. Completar o volume para 50,0 mL.

d) Preparo final da solução tampão TSE

Componentes	Quantidade
Solução A (Tris 1M).....	5,0 mL
Solução B (Cloreto de sódio 5M).....	10,0 mL
Solução C (EDTA 0,2M).....	2,5 mL
Água bidestilada q.s.p.....	982,5 mL

Preparo:

Acrescentar à 982,5 mL de água bidestilada, as soluções A, B e C nos volumes acima indicados. Agitar e esterilizar em autoclave, a 121 °C durante 15 minutos.

Para extração do ácido nucléico viral

4.2.2.4 Solução tampão de lise 5x

Na preparação da solução tampão de lise 5x devem ser utilizadas cinco soluções preparadas da seguinte forma:

a) Solução A: Solução tampão Tris-HCl 1,0M pH 8,3.

A preparação desta solução deve ser realizada como descrita no anexo 1.3.1, com exceção do pH final que deve ser ajustado, neste caso, para 8,3.

b) Solução B: Solução de cloreto de potássio 2,0M

Componentes	Quantidade
Cloreto de potássio (KCl) p.a.....	7,45 g
Água ultra pura q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Dissolver 7,45 g de cloreto de potássio em água ultra pura. Completar o volume para 100,0 mL. Esterilizar em autoclave, a 121 °C durante 15 minutos.

c) Solução C: Solução de cloreto de magnésio 1,0M

A preparação desta solução deve ser realizada como descrita no Anexo 7.3.5.2.

d) Solução E: NP-40 a 20%

Componentes	Quantidade
NP-40 (Nonidet P-40) p.a.....	20,0 mL
Água ultra pura.....	80,0 mL

Preparo:

Acrescentar 20,0 mL de NP-40 em 80,0 mL de água ultra pura. Agitar para dissolução.

e) Preparo final da solução tampão de lise 5x

Componentes	Quantidade
Solução A (Tris HCl 1,0M).....	2,5 mL
Solução B (Cloreto de potássio 2,0M).....	1,75 mL
Solução C (Cloreto de magnésio 1,0M).....	0,25 mL
Solução D (Complexo de vanadil-ribonucleosídeo 200mM) p.a (Sigma).....	1,25 mL
Solução E (NP-40 a 20%).....	1,25 mL
Água ultra pura estéril.....	3,0 mL

Preparo:

Acrescentar em 3,0 mL de água ultra pura estéril, as soluções A, B, C, D e E nos volumes indicados. Agitar, dividir em volumes de 1,0 mL e estocar a -20°C.

4.2.2.5 Fenol-TE

Componentes	Quantidade
Fenol p.a.....	200,0 mL
Solução tampão TE.....	200,0 mL

Preparo:

Dissolver aproximadamente 200,0 g de fenol em banho-maria a 80°C. Após liquefação, misturar 200,0 mL de fenol com 200,0 mL da solução tampão TE, pH 8,9. Homogeneizar vigorosamente, deixando a mistura em repouso. Remover a parte superior da mistura e acrescentar o mesmo volume de solução tampão TE pH 8,9. Repetir o processo mais uma vez. Checar o pH final da mistura que deverá ser 7,0-7,2.

4.2.2.6 Solução tampão TE

Componentes	Quantidade
Solução tampão Tris-HCl 1,0M, pH 7,6 (Item 4.2.2.1)....	5,0 mL
Ácido etilenodiaminotetracético p.a.....	0,1861 g
Água ultra pura q.s.p.....	500,0 mL
pH 7,8	

Preparo:

Dissolver os componentes em água ultra pura. Agitar até completa dissolução. Completar o volume final para 1000 mL. Esterilizar em autoclave, a 121°C durante 15 minutos.

4.2.2.7 Solução de clorofórmio + álcool isoamílico 24:1

Componentes	Quantidade
Clorofórmio p.a.....	24,0 mL
Álcool isoamílico p.a.....	1,0 mL

Preparo:

Em um frasco âmbar acrescentar 24,0 mL de clorofórmio e 1,0 mL de álcool isoamílico. Homogeneizar e estocar em temperatura ambiente.

Obs.: preparar a solução em capela.

4.2.2.8 Solução de cloreto de lítio 4,0M

Componentes	Quantidade
Cloreto de lítio (LiCl) p.a.....	4,24 g
Água ultra pura q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Dissolver 4,24 g de cloreto de lítio em água ultra pura. Completar o volume para 100,0 mL. Esterilizar em autoclave, a 121°C durante 15 minutos.

Para a Técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida**4.2.2.9 Solução de Acrilamida/Bis-acrilamida 38:2**

Componentes	Quantidade
Acrilamida p.a.....	38,0 g
N,N' metileno bis-acrilamida p.a.....	2,0 g
Água bidestilada q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar e dissolver os componentes separadamente em um pouco de água. Misturar as soluções e completar o volume final. Envolver o frasco com papel alumínio. Estocar a 4°C.

4.2.2.10 Solução tampão TBE 10x

Componentes	Quantidade
Trizma-base p.a.....	324,0 g
Ácido bórico p.a.....	165,0 g
Ácido etilenodiaminotetracético p.a.....	30,0 g
Água ultra pura q.s.p.....	3000,0 mL

Preparo:

Dissolver os componentes em água ultra pura. Agitar até completa dissolução. Completar o volume final para 3000,0 mL. Esterilizar

em autoclave, a 121 °C durante 15 minutos. Manter em temperatura ambiente.

4.2.2.11 Solução tampão TBE 1x

Componentes	Quantidade
Solução tampão TBE 10x.....	200,0 mL
Água ultra pura estéril.....	1800,0 mL

Preparo:

Adicionar 200,0 mL da solução tampão TBE 10x em 1800,0 mL de água ultra pura estéril. Agitar para completa dissolução. Manter em temperatura ambiente.

4.2.2.12 Solução de persulfato de amônia a 10%

Componentes	Quantidade
Persulfato de amônia (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈) p.a.....	10,0 g
Água ultra pura q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Dissolver 10,0 g de persulfato de amônia em água ultra pura. Completar o volume para 100,0 mL. Envolver o frasco com papel alumínio. Estocar a 4 °C.

4.2.2.13 Corante DAI (6x loading buffer + 40% sacarose)

Componentes	Quantidade
Azul de bromofenol p.a.....	0,25 g
Xylene cyanol FF p.a.....	0,25 g
Sacarose p.a.....	40,0 g
Água bidestilada q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar os componentes e dissolver em água bidestilada. Agitar até a completa dissolução. Completar o volume final. Dividir em pequenas porções. Envolver cada frasco com papel alumínio. Estocar a 4 °C.

Para Aplicação da Reação de PCR nas Amostras Previamente Tratadas

4.2.2.14 Solução tampão de PCR 10x

Componentes	Quantidade
Solução tampão Tris-HCl 1,0M, pH 8,3.....	50,0 mL
Solução de cloreto de potássio 2,0M.....	35,0 mL

Solução de cloreto de magnésio 1,0M.....	5,0 mL
Solução de ditiotreitol 1,0M.....	10,0 mL
Gelatina p.a.....	0,1 g

Preparo:

Dissolver os componentes na ordem indicada. Agitar, dividir em volumes de 10,0 mL e estocar a -20 °C.

4.2.2.15 Gel de poliacrilamida a 12%

Componentes	Quantidade
Acrilamida/bis-acrilamida 38:2 p.a.....	19,8 mL
Solução tampão TBE 10x.....	6,3 mL
Água ultra pura.....	42,8 mL
Solução de persulfato de amônia a 10%.....	1,25 mL
TEMED p.a.....	31 L

Preparo:

Acrescentar os componentes em um bequer, na ordem indicada acima, homogeneizando lentamente para completa dissolução. Adicionar esta mistura entre duas placas de vidro, previamente preparadas, colocar o pente no gel, e deixar o sistema em repouso, ligeiramente inclinado, no mínimo durante 1 hora para polimerização do gel.

4.3 Esterilização das soluções e meios de cultura**4.3.1 Filtração**

A filtração de soluções ou de meios de cultura que contêm substâncias termolábeis, é feita com pressão positiva ou vácuo, usando-se membranas de éster de celulose acopladas, com as seguintes porosidades: 0,45 µm e 0,22 µm. Pré-filtros clarificantes de fibra de vidro, podem também ser incluídas e, as de tipo AP-20 são as mais indicadas. A montagem das membranas deve ser feita obedecendo uma ordem decrescente de porosidade. Todos os materiais e equipamentos utilizados para a filtração deverão ser esterilizados previamente por autoclavação a 121 °C durante 30 minutos.

4.3.2 Autoclavação

Esterilizações de soluções ou de meios de cultura em autoclave devem ser feitos em temperatura de 121 °C durante 15 minutos. Durante a autoclavação de meios de cultura, não deve haver excesso de aquecimento para evitar uma sobrecarga térmica que possa produzir hidrólise, peptonação, caramelização ou outro tipo de destruição das substâncias que constituem os meios de cultura.

4.4 Armazenamento de soluções

As soluções são armazenadas em refrigerador (2 a 8 °C) ou em

congelador (-20 °C). São mantidas em frascos bem fechados, com rolhas de borracha ou tampa de rosca, pois os tampões de algodão podem permitir a entrada e a consequente absorção de substâncias inespecíficas. Soluções alcalinas não devem ser estocadas em frascos de vidro por muito tempo, pois estes frascos são lentamente dissolvidos e íons de metais pesados são, posteriormente, encontrados nessas soluções.

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Princípio do método

Através da aplicação direta da reação em cadeia de polimerase (PCR), em concentrados de amostras ambientais, é possível evidenciar a presença de poliovírus. A PCR, baseada no uso da Taq polimerase, é uma reação enzimática "in vitro" que aumenta ou amplifica sequências genômicas específicas desses vírus, sendo a aplicação deste método dependente de conhecimento prévio dessas sequências, da disponibilidade de primers específicos, como também do estabelecimento de condições ideais para a reação. Essa técnica permite a amplificação simultânea de segmentos genômicos distintos de diferentes poliovírus, desde que sejam utilizados primers específicos durante a reação. Os produtos da reação são detectados por eletroforese em gel de poliacrilamida, corados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

5.2 Procedimento

5.2.1 Tratamento dos Concentrados Finais das Amostras de Águas de Esgoto

5.2.1.1 Reconcentração por ultracentrifugação

- a) Colocar 8,5 mL do concentrado final da amostra em dois tubos, da ultracentrífuga IEC/B-60 correspondentes ao rotor de 60 000 rpm.
- b) Tarar os tubos (que contêm a amostra) com as respectivas tampas de metal.
- c) Colocar os tubos no rotor; ajustar bem a tampa do mesmo e ultracentrifugar a 41 000 rpm durante 2 horas e 30 minutos.
- d) Após ultracentrifugação, desprezar o sobrenadante gentilmente, tomando o cuidado para não ressuspender o precipitado.
- e) Suspender o precipitado em 0,5 mL de solução tampão Tris 10mM, pH 7,4.
- f) Transferir esse concentrado para um tubo Eppendorf de 1,5 mL, devidamente identificado.
- g) Se não for possível processá-lo imediatamente, conservar o tubo em freezer a -70 °C.

5.2.1.2 Tratamento com Freon e Coluna de Sefadex

- a) Descongelar o tubo Eppendorf que contém o concentrado final da amostra e acrescentar o mesmo volume de Freon destilado, isto é: 0,5 mL de Freon (Freon=1,1,2 Triclorotrifluoretano; deve ser usado sempre destilado). Usar luvas durante todo o trabalho. Todos os materiais utilizados com Freon devem ser desprezados em um recipiente separado.
- b) Homogeneizar em vortex durante 30 segundos.
- c) Centrifugar em microcentrifuga durante 1 minuto.
- d) Colher o sobrenadante e transferi-lo para um tubo Eppendorf de 1,5 mL e manter sob refrigeração para preparar a coluna de Sefadex.
- e) Preparo da coluna de Sefadex.
 - em uma seringa de 3 mL acrescentar, com o auxílio de pinça e tesoura, uma pequena quantidade de lã de vidro tratada com salina,
 - colocar a ponta da seringa dentro de um pequeno tubo coletor de líquido,
 - a seguir, adicionar 2,5 mL da matriz de Sefadex (mistura de G25 + G200), previamente preparada,
 - adicionar, sobre a matriz, 0,5 mL da solução tampão TSE,
 - centrifugar a 1 000 rpm durante 4 minutos,
 - desprezar o líquido residual do tubo coletor e acrescentar, sobre a matriz de Sefadex, 0,5 mL da solução tampão TSE, centrifugar a 1 000 rpm durante 4 minutos e desprezar o líquido residual contido no tubo coletor. Repetir o processo mais uma vez.
 - acrescentar na coluna de Sefadex, assim tratada, 0,5 mL da amostra de esgoto bruto tratada com freon. Centrifugar a 1 000 rpm durante 4 minutos, recolher a amostra contida no tubo coletor e transferi-la para um tubo Eppendorf de 1,5 mL, devidamente identificado.
 - transferir 80 µL dessa amostra para um tubo Eppendorf de 0,5 mL, devidamente identificado.
 - conservar as amostras em freezer a -70°C

5.2.2 Extração do ácido nucléico viral

5.2.2.1 Preparo da amostra (Lise)

- a) Preparar a bancada com papel de filtro e todo o material necessário. Usar luvas durante todo o trabalho.
- b) Preparar o banho de gelo em caixa de isopor.
- c) Descongelar o tubo Eppendorf de 0,5 mL que contém 80 L da amostra e acrescentar no mesmo 20 L da solução tampão de lise 5 x concentrada. No mesmo grupo de reações acrescentar um tubo 80 µL de água bidestilada

que será um dos controles do teste.

- d) Homogeneizar em vortex 1 a 2 minutos.
- e) Manter a mistura em banho de gelo durante 10 minutos.

5.2.2.2 Tratamento com fenol e cloroformio

- a) Acrescentar 100 μ L de fenol + TE aos 100 μ L da mistura acima descrita (amostra + tampão de lise). Todos os materiais utilizados com fenol devem ser desprezados em um recipiente separado.
- b) Homogeneizar em vortex durante 1 a 2 minutos.
- c) Centrifugar em microcentrífuga a 12000 rpm durante 1 minuto.
- d) Colher o sobrenadante (\approx 100 μ L) e transferí-lo para outro tubo Eppendorf de 0,5 mL.
- e) Acrescentar 100 μ L da solução de cloroformio + álcool isoamílico 24:1.
- f) Homogeneizar em vortex durante 1 a 2 minutos.
- g) Colher o sobrenadante (\approx 100 μ L) e transferí-lo para outro tubo Eppendorf de 0,5 mL.

5.2.2.3 Tratamento com cloreto de lítio, precipitação com etanol e secagem à vácuo do material genético viral

- a) Aos 100 μ L da amostra, descrita acima no item g, acrescentar 5 μ L da solução de cloreto de lítio 4M e 300 μ L de álcool absoluto mantido a -20°C .
- b) Homogeneizar rapidamente.
- c) Manter a -20°C durante a noite ou em gelo seco durante 1 hora.
- d) Colocar a microcentrífuga na câmara fria e centrifugar a amostra a 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C .
- e) Descartar o sobrenadante suavemente, com o auxílio de micropipetador.
- f) Acrescentar 300 μ L de álcool etílico a 70%, mantido a -20°C .
- g) Centrifugar em microcentrífuga a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C .
- h) Descartar o sobrenadante gentilmente, com o auxílio de micropipetador.
- i) Acrescentar 300 μ L de álcool absoluto, mantido a -20°C .
- j) Centrifugar em microcentrífuga a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C .
- k) Descartar o sobrenadante gentilmente, com o auxílio de micropipetador.
- l) Colocar os tubos, com o material genético precipitado na microcentrífuga à vácuo durante 5 minutos, para secá-los. Ligar o sistema de refrigeração da microcentrífuga 10 a 15 minutos antes do uso, verificando se o compartimento da mesma está completo

com álcool metílico (metanol).

- m) Retirar os tubos da microcentrífuga a vácuo, e suspender o material genético precipitado com 30 μ L da solução tampão TE pH 7,8. Conservar os tubos a -20°C .

5.2.3 Aplicação da reação da PCR nas amostras previamente tratadas

- a) Limpar a câmara de fluxo laminar vertical de PCR e prepará-la para o teste com todos os materiais necessários. Usar luvas durante todo o trabalho.
- b) Preparar o banho de gelo em caixa de isopor.
- c) Separar todos os reagentes necessários para a reação e mantê-los em banho de gelo. Devem ser utilizados:
- primers
 - RNase inibidor (10 μ / μ L)
 - Transcriptase reversa (5 μ / μ L)
 - Tampão PCR 10x
 - Taq polimerase (5 μ / μ L)
 - d NTP (1mM cada)
 - água bidestilada estéril e filtrada
 - controle positivo
- d) Na câmara de fluxo laminar vertical, numerar um tubo Eppendorf de 1,5 mL como PCR mix #1, e outro como PCR mix #2.
- e) Também, no fluxo, numerar novos tubos Eppendorf de 0,5 mL para as amostras em teste, 01 tubo para o controle positivo e 01 para o controle negativo. Preparar então a mistura #1.
- f) Preparo da PCR mix #1
- no tubo Eppendorf de 1,5mL, previamente identificado, acrescentar: primers, o tampão PCR 10x, d NTPs e água bidestilada estéril e filtrada.
 - a quantidade de cada reagente a ser utilizada é calculada de acordo com o total de amostras a ser analisada.
- Para uma amostra, utilizar:
- a) 2 μ L de cada primer
 - b) 10 μ L de tampão PCR 10x
 - c) 20 μ L de d NTP
 - d) usar água bidestilada filtrada e estéril para completar o volume total necessário.
 - e) após o preparo manter a mistura em banho de gelo e preparar a PCR mix #2.
- g) Preparo da PCR mix #2
- no tubo Eppendorf de 1,5mL, previamente identificado, acrescentar: RNase inibidor, transcriptase reversa, Taq polimerase e água bidestilada estéril e filtrada.
 - a quantidade de cada reagente a ser utilizada é

calculada de acordo com o total de amostras a ser analisada. Para uma amostra, utilizar:

- a) 1 μL de RNase inibidor com 10 $\mu/\mu\text{L}$
 - b) 1 μL de transcriptase reversa com 5 $\mu/\mu\text{L}$
 - c) 0,5 μL de Taq polimerase com 5 $\mu/\mu\text{L}$
 - d) usar água bidestilada filtrada e estéril para completar o volume total necessário.
 - e) após o preparo manter a mistura em banho de gelo.
- h) Descongelar as amostras a serem testadas e manter em banho de gelo.
 - i) Acrescentar 64 μL da PCR mix #1 em cada um dos novos tubos Eppendorf, previamente identificados.
 - j) A seguir, acrescentar 5 μL de cada amostra no respectivo tubo Eppendorf como também 5 μL dos controles positivo e negativo (água bidestilada estéril e filtrada).
 - k) Homogeneizar em vortex rapidamente.
 - l) Adicionar em cada tubo 2 gotas de óleo mineral estéril, tipo Nujol.
 - m) Centrifugar em microcentrífuga a 12000 rpm durante 1 minuto.
 - n) Colocar os tubos na Máquina da PCR, a 95°C durante 3 minutos. Para obter o tempo necessário (3 minutos), ajustar o equipamento para 5 minutos.
 - o) Centrifugar em microcentrífuga a 12000 rpm durante 1 minuto.
 - p) Acrescentar em cada tubo Eppendorf, 27 μL da PCR mix #2.
 - q) Homogeneizar em vortex rapidamente.
 - r) Centrifugar em microcentrífuga a 12000 rpm durante 1 minuto.
 - s) Colocar os tubos na Máquina de PCR, na File #10. Essa "File" já está programada para todos os ciclos necessários ao teste, descritos no caderno de registro. Anotar no respectivo caderno o tempo de uso do equipamento.
 - t) Após o término de todos os ciclos da reação, retirar os tubos da máquina, conservá-los a 8°C e aplicar o conteúdo dos mesmos em gel de poliacrilamida.

5.2.4 Técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida

5.2.4.1 Preparo do gel

- a) Antes de iniciar o trabalho, limpar a bancada colocar sobre a mesma papel de filtro e os equipamentos necessários. Utilizar luvas durante todo o trabalho.
- b) Limpar as placas de vidro, lavando-as com Extran diluído e enxaguá-las com água de torneira e água destilada. Secar com papel de filtro. Utilizar o mesmo processo para os espaçadores e o pente.

- c) Com o auxílio de uma gaze limpar bem cada placa, de ambos os lados, com álcool metílico (metanol). Secar com uma gaze limpa.
- d) Proceder à montagem das placas:
 - colocar os dois espaçadores sobre uma das placas,
 - juntar a outra placa,
 - fixá-las com as garras de pressão,
 - vedar as laterais do sistema de placas e a parte inferior do mesmo com fita adesiva transparente. Colocar um reforço da fita adesiva nas extremidades inferiores do sistema,
 - fixar bem o sistema com as garras de pressão.
- e) Preparar o gel.
- f) Após o preparo do gel, adicionar a mistura entre o sistema das duas placas de vidro, previamente preparadas. Colocar o pente no gel no local adequado.
- g) Deixar o sistema em repouso, ligeiramente inclinado durante 1 a 2 horas para a polimerização do gel.

5.2.4.2 Aplicação no gel, das amostras amplificadas através do PCR

- a) Após a polimerização do gel, retirar as garras de pressão e a fita adesiva da parte inferior do sistema
- b) Lavar a placa com água destilada.
- c) Com todo o cuidado, retirar o pente e acertar a beirada do gel com o auxílio de um bisturi. Lavar com água destilada.
- d) Acrescentar inicialmente, 100 a 200 mL de solução tampão TBE 1 x concentrada nos dois reservatórios de uma cuba acrílica (sistema vertical)
Obs.: Preparar um total de 1500 mL de solução tampão TBE 1 x concentrada.
- e) Fixar com o auxílio das garras de pressão, o sistema de placas contendo o gel, na cuba acrílica que contém dois reservatórios separados verticalmente.
- f) Preencher os reservatórios com a solução do tampão TBE 1 x concentrada. Verificar se não está ocorrendo vazamento.
- g) Preparar novos tubos Eppendorf para todas as amostras e um tubo para o marcador de peso molecular. Numerar todos os tubos.
- h) Acrescentar em cada tubo Eppendorf 2 µL da solução corante DAI.
- i) Acrescentar no tubo correspondente ao marcador de peso molecular, 3 µL do respectivo reagente.
- j) Transferir para os respectivos tubos Eppendorf, 20 µL de cada amostra e dos controles positivo e negativo. Trocar as ponteiros entre as inoculações.
- k) Com o auxílio do micropipetador e das respectivas ponteiros, aplicar os 5 µL do marcador de peso

molecular como também aplicar os 22µL de cada amostra e dos respectivos controles positivo e negativo, nas canaletas formadas no gel de poliacrilamida. Começar a inoculação da esquerda para a direita, sendo que a primeira canaleta receberá o marcador de peso molecular, a segunda o controle positivo e as demais receberão as amostras em teste. A última inoculação será a do controle negativo. Trocar as ponteiras entre as inoculações.

5.2.4.3 Corrida Eletroforética

- a) Após terminada a inoculação, verificar os níveis da solução tampão nos dois reservatórios da cuba e então ligar o sistema a uma fonte de energia elétrica, regulando-se a mesma para fornecer 200 volts durante 3 horas.
- b) Durante a corrida eletroforética, checar periodicamente o nível do tampão nos dois reservatórios da cuba. Se necessário completar o volume do reservatório superior, tomando o cuidado para que o reservatório inferior não receba solução tampão em excesso.
- c) Após a corrida eletroforética, desligar a fonte, retirar as garras de pressão, e tomando cuidado, remover o sistema de placas da cuba. Desprezar a solução tampão existente na cuba e enxaguá-la com água destilada.

5.2.4.4 Coloração do gel

- a) Retirar a fita adesiva das laterais do sistema de placas, a seguir retirar os dois espaçadores e com cuidado destacar uma das placas de vidro.
- b) Retirar o gel, colocando-o em um recipiente com água destilada.
- c) Acrescentar 25 µL da solução de brometo de etídeo (10 mg/mL), deixando o gel em contato com esta solução durante 3 a 5 minutos.

5.2.4.5 Fotografia em transiluminador

- a) Na sala de fotografia, colocar o gel sobre o transiluminador e fotografar com o sistema de fotografia contendo filme Polaroid tipo 57.
- b) Nunca ligar o transiluminador sem estar usando óculos ou máscara de proteção facial contra radiação ultravioleta.
- c) Retirar a foto da máquina, após alguns segundos, abri-la e colar a mesma no protocolo de resultados.
- d) Secar o transiluminador com papel macio.
- e) Se necessário, guardar o gel ou secá-lo.

6 RESULTADOS

6.1 Após a visualização das características de migração eletroforética dos ácidos nucleicos amplificados, compará-los com a migração eletroforética dos ácidos nucleicos dos respectivos padrões e anotar os resultados do teste.

/ANEXO A

ANEXO A - PROCEDIMENTOS COMPLEMENTARES**A-1 Ensaio de controle****A-1.1 Teste de esterilidade**

Após terem sido preparados, e antes de serem usados, quaisquer soluções ou meios de cultura são rotineiramente testados, quanto à presença de fungos e/ou bactérias. Este teste consiste na inoculação de 1 mL do volume de cada frasco da solução em teste em 2 tubos de caldo de soja e triptona os quais após semeadura são incubados a 35 °C durante o mínimo de 48 horas (deve-se efetuar leituras diárias até completar 14 dias). Constitui evidência da presença de microrganismos qualquer turvação do caldo triptona-soja.

Essa contaminação pode ser decorrente de falhas no processo de esterilização ou contaminação após a esterilização. Além disso, os frascos contendo as soluções ou meios de cultura permanecem por 14 dias à temperatura ambiente ao abrigo da luz, como teste adicional de esterilidade, antes de serem armazenadas em refrigerador (2 a 8 °C).

A-1.2 Lavagem, preparo e esterilização do material para cultura celular

Ver Norma CETESB M1.002.

A-1.3 Controle de qualidade dos meios de cultura

Ver Norma CETESB L5.216.

A-1.4 Controle da qualidade da água destilada

A água destilada, a ser empregada em laboratórios de virologia, deve ser de alta qualidade, livre de substâncias tóxicas ou nutritivas que possam influenciar na sobrevivência e crescimento de microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, através da realização de testes específicos (ver Norma CETESB L5.215 - Prova de adequabilidade da água destilada para fins microbiológicos).

A-1.5 Controle da adequabilidade biológica da água bidestilada

Devem ser efetuados testes de adequabilidade biológica da água bidestilada para garantir a produção de uma água de alta qualidade livre de substâncias tóxicas ou nutrientes que possam interferir nos ensaios virológicos (ver Norma CETESB L5.215).

A-1.6 Armazenamento da água bidestilada

A água bidestilada deve ser armazenada em frascos limpos de vidro neutro, de preferência ao abrigo da luz e protegidos de pó ou vapores que possam ser produzidos no laboratório. O armazenamento prolongado da água bidestilada deve ser evitado.

A-1.7 Controle da eficiência da autoclave

Utilizar ampolas com suspensão de esporos *Bacillus stearothermophilus* em meios de cultura, colocando-os entre os frascos ou os materiais a serem esterilizados. Estas ampolas, depois da autoclavação, são incubadas em banho-maria, a 55 °C durante 24-48 horas. Se houver mudança da coloração da suspensão contida nas ampolas, de roxa para amarela, significa que a esterilização foi insuficiente pois houve desenvolvimento de bactérias.

A-1.8 Controle de esterilidade de vidraria e materiais

É recomendável a realização de testes específicos para avaliar e comprovar a esterilidade de vidraria e materiais submetidos à esterilização em estufa a 170-180 °C, ou em autoclave a 121 °C. Para a realização deste teste, ver Norma CETESB L5.010 - Avaliação de laboratórios de análises microbiológicas de água.

A-2 Local de trabalho

A-2.1 As capelas de segurança biológica devem estar localizadas em áreas de movimento reduzido livres de poeiras, não deve haver movimentação excessiva do ar devido ao uso de ventiladores, exaustores, etc., conversa desnecessária deve ser evitada.

A-2.2 A limpeza da sala é feita após expediente diária sem varreções exageradas e, de preferência, empregando solução de formalina ou de outro desinfetante. Chão, mesas e balcões são limpos diariamente. No fim da semana realiza-se uma limpeza mais rigorosa, inclusive do teto e da parede. Após a limpeza, o ambiente é impregnado com formol, que é colocado em placas de Petri para evaporar.

A-2.3 Se a capela estiver instalada em local com ar condicionado a entrada de ar não deve ser dirigida diretamente sobre o campo de trabalho, a não ser que o condicionador tenha um filtro de ar especial.

A-3 Precauções

Dentre as pessoas que trabalham no laboratório, aquelas que tem menor tempo de treinamento e as que estão mais diretamente associadas a manobras com material infectado são as que apresentam maiores possibilidades de serem infectadas acidentalmente.

A inalação de aerossóis, a aspiração de soluções contaminadas através de pipetas, acidentes de centrifugação, etc., provocam, comprovadamente, grande número de infecções acidentais e devem ser prevenidas pelo uso de máscaras descartáveis de papel, pipetadores e pela obediência às instruções específicas de trabalho e de uso do equipamento (ver Norma CETESB L5.009 - Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia).

A-3.1 Material de segurança

A-3.1.1 Aventais de plástico

Devem ser de plástico resistente e de comprimento adequado para a proteção do técnico durante os processos de lavagem.

A-3.1.2 Aventais de tecido

Para uso obrigatório por todos os técnicos na execução de quaisquer atividades laboratoriais. Antes do encaminhamento para lavagem, os aventais devem ser esterilizados em autoclave a 121°C durante 30 minutos.

A-3.1.3 Luvas de amianto

A-3.1.4 Protetor facial

De utilização obrigatória (juntamente com máscara, com filtro adequado e luvas) no preparo de solução de ácidos a serem empregados na lavagem de materiais.

/ANEXO B

ANEXO B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B-1 ALEXANDER, L.M. The application of molecular virology to the detection of pathogenic viruses in water. Medmenhan, U. K., WRC, 1988 (Interim report, No. 1).
- B-2 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Detection of enteric viruses. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 17 ed. Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1989. p. 155-183.
- B-3 BERG, G.; BODILY, H. L.; LENNETTE, E. H.; MELNICK, J. L.; METCALF, T. G. Viruses in water. Washington, American Public Health Association, 1976. 256p.
- B-4 CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Molecular methods for the characterization of polioviruses. U. S. Department of Health and Human Services. Atlanta, Georgia, 1991.
- B-5 CETESB - Lavagem, preparo e esterilização do material para cultura celular. São Paulo, 1985, 1ª revisão, (Norma Técnica M1.002).
- B-6 CETESB - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1985. 1ª revisão (Norma Técnica L5.215).
- B-7 CETESB - Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia. São Paulo, 1986. 1ª revisão (Norma Técnica L5.009).
- B-8 CETESB - Enterovírus - Método de concentração de amostras de água de esgoto por adsorção a hidróxido de alumínio. São Paulo, 1989. 1ª revisão (Norma Técnica L5.505).
- B-9 ERLICH, H. A. PCR technology: principles and applications for DNA amplification. New York, Stockton Press, 1989. 246p.
- B-10 FEACHEM, R. G.; BRADLEY, D. J.; GARELICK, H.; MARA, D. D. Sanitation and disease health aspects of excreta and wastewater management. New York, John Wiley, 1983. p. 133-172.
- B-11 GERBA, C. P.; MARGOLIN, A. B.; HEWLETT, M. J. Application of gene probe to virus detection in water. Water Sci. Technol., 21: 147-154, 1989.
- B-12 IAWPRC STUDY GROUP ON WATER VIROLOGY. The health significance of viruses in water. Water Res., 17: 121-132, 1983.

-
- B-13 INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T.J. PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego, Academic Press, 1990. 482p.
- B-14 KEW, O. M.; NOTTAY, B. K.; RICO-HESSE, R.; PALLANSCH, M. A. Molecular epidemiology of wild poliovirus transmission. Appl. virol. Res., 2, 1990.
- B-15 LENNETTE, E. H.; SCHMIDT, N. J. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 5th Edition, APHA, 1979. p. 471-534.
- B-16 MARQUES, E. Utilização de análises virológicas de águas de esgoto no acompanhamento de programas de vacinação contra a poliomelite para avaliar a circulação de poliovírus selvagem no meio ambiente. São Paulo, 1990. 147 p. (Tese de doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. de São Paulo).
- B-17 METCALF, T. G.; JIANG, X.; ESTES, M. K.; MELNICK, J. L. Nucleic acid probes and molecular hybridization for detection of viruses in environmental samples. Prog. Med. Virol., 35: 186-214, 1988.
- B-18 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed. New York, Cold Spring Harbor, 1989.
- B-19 SILVA, E. E.; SCHATZMAYR, H. G.; KEW, O. M. Nucleotide sequences of the VP1 capsid proteins of wild poliovirus types 1 and 3 from epidemic areas of Brazil. Braz. J. Med. Biol. Res., 23: 1-5, 1990.
-