

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ROTAVÍRUS DO GRUPO A ASSOCIADOS À DIARRÉIA
INFANTIL NA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO, MG,
BRASIL.**

ANA CAROLINA BERNARDES DULGHEROFF

**UBERABA – MG
2010**

ANA CAROLINA BERNARDES DULGHEROFF

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ROTAVÍRUS DO GRUPO A ASSOCIADOS À DIARRÉIA
INFANTIL NA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO, MG,
BRASIL.**

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de pós-graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração “Microbiologia”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz da Silva Domingues

**UBERABA – MG
2010**

“Cumprir tarefas é parte obrigatória do nosso desenvolvimento. Mas, à medida que crescemos e adquirimos conhecimentos, não mais realizamos simples tarefas; traçamos metas e alcançamos ideais.

E a sabedoria é a mais difícil das conquistas, mas se torna possível quando encaramos nossos objetivos como sonhos palpáveis – realidade que nos seduz e alegra.

O sonho é, pois, a chave que nos liberta e abre as portas do mais belo caminho, rumo à Perfeição.”

Diogo Aparecido Ferreira

Dedico esta dissertação aos meus pais, que são meus verdadeiros mestres, exemplos de caráter, perseverança, dedicação e também aos meus irmãos e meu noivo pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conduzir, durante todo o tempo e renovar minhas energias para que perseverasse.

Aos meus pais, por me amar incondicionalmente, por compreender minha ausência e por priorizarem em suas vidas os meus objetivos.

Aos meus irmãos, principalmente ao Pedro que sempre estava disposto a me ouvir e ajudar no que fosse preciso.

Ao meu noivo Ronaldo por ter compreendido minha ausência, pelo carinho e dedicação.

Ao meu orientador Professor Dr. André Luiz da Silva Domingues pela dedicação, respeito, confiança, amizade e acima de tudo pela partilha diária do conhecimento e experiência.

A professora Dra. Adriana Gonçalves Oliveira, que me recebeu no laboratório de Microbiologia e sempre me ajudou no que precisei.

A minha cunhada Cris Boletti e a toda sua família por terem me ajudado na coleta das amostras.

A minha cunhada Fabiana por sempre estar disposta a ajudar e pelo companheirismo.

A todos os amigos do Laboratório de Microbiologia: Sônia, Miguela, Natália, Fernanda, Maxelle, Aline, Larissa, Paulo, Renata, Patrícia e Celso pela amizade, pela cumplicidade e exemplo de dedicação.

Aos meus companheiros de laboratório: Luciana, Kelson, Elisson e Lívia que me ajudaram na coleta e processamento das amostras.

A todos meus colegas de mestrado por me ajudarem nos momentos difíceis.

A todos os meus amigos por compreenderem minha ausência e me apoiarem.

A todos os professores do curso de pós-graduação em Ciências Fisiológicas que contribuíram para minha formação; em especial ao Professor Dr. Valdo José Dias da Silva, Professor Dr. Virmondes Rodrigues Junior, a Professora Dra. Roseli A. da Silva Gomes e a Professora Dra. Maria Laura que abriram as portas dos laboratórios para que eu pudesse realizar minha pesquisa.

Ao Kênio, Lúcio e a Professora Maria Imaculada pelo auxílio com os dados estatísticos.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida, que me possibilitou a realização da pesquisa.

Ao CNPq pelos recursos financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos Laboratórios IPAC de Uberlândia e Jorge Furtado de Uberaba, por terem fornecido as amostras para realização de nossa pesquisa.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Histórico.....	15
1.2 Classificação e Estrutura.....	16
1.3 Replicação viral	20
1.4 Transmissão e patogênese.....	21
1.5 Características clínicas e tratamento.....	22
1.6 Imunidade.....	23
1.7 Diagnóstico laboratorial e caracterização viral.....	24
1.8 Epidemiologia.....	24
1.9 Prevenção e controle.....	30
2 JUSTIFICATIVA.....	33
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 População do estudo e amostras.....	37
4.2 Detecção de Rotavírus nas amostras fecais.....	37
4.3 Caracterização dos RV do grupo A quanto aos seus eletroferotipos.....	39
4.4 Caracterização dos genótipos G e P das amostras de RV do grupo A circulantes através da RT-PCR.....	39
4.5 Análise dos aspectos epidemiológicos observados nas amostras estudadas.....	44
4.6 Análise estatística.....	45
5.0 RESULTADOS.....	47
5.1 Amostragem e frequência da infecção por RV do grupo A na amostra estudada.....	47
5.2 Sazonalidade dos casos de diarreia e de rotavirose.....	50
5.3 Caracterização dos RV do grupo A quanto aos seus eletroferotipos e associação aos aspectos epidemiológicos.....	52
5.4 Identificação dos genótipos G e P dos RV do grupo A circulantes e associação com os dados epidemiológicos.....	56
5.5 Elegibilidade à vacinação para RV.....	59
6 DISCUSSÃO.....	62
CONCLUSÃO.....	68
7 CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS	71
ANEXO I: Folha de aprovação do Comitê de Ética.....	84
ANEXO II : Preparo de soluções.....	85

LISTA DE ABREVIATURA

DMSO – dimetilsulfóxido

cDNA – *complementary Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucléico complementar)

EGPA – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

GITC – *Guanidinium thiocyanate* (Isotiocinato de Guanidina)

IFN- γ - interferon gama

IP3 - inositol 1,4,5-trifosfato

IPAC – Laboratório IPAC

JF- Laboratório Jorge Furtado

NSP – *Non-Structural Proteins* (Proteínas não estruturais)

NSP4e – *Non-Structural Protein 4 extracellular* (Proteína não estrutural 4 extracelular)

NSP4i – *Non-Structural Protein 4 intracellular* (Proteína não estrutural 4 intracelular)

NT – não tipado

pb - pares de base

PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão Fosfato Salina)

PI3K - fosfatidilinositol-3-cinase

PLC – Fosfolipase C

RAL – Região aberta de leitura

RE – Retículo Endoplasmático

dsRNA – *double-stranded Ribonucleic Acid* (ácido ribonucléico de fita dupla)

ssRNA – *single-stranded Ribonucleic Acid* (ácido ribonucléico de fita simples)

mRNA – *messenger Ribonucleic Acid* (ácido ribonucléico mensageiro)

RT – *Reverse Transcription* (Transcrição Reversa)

RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa)

RV – Rotavírus

Tampão TBE – Tampão Tris-Boro-EDTA

TNF- α - *Tumor necrosis factor alfa* (Fator de Necrose Tumoral alfa)

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

UV – Ultra-Violeta

VP – *Viral Structural Proteins* (Proteínas Virais Estruturais)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de amostras analisadas, número e proporção de amostras positivas para RV do grupo A, ao longo do período estudado, por cidade.....	49
Tabela 2: Número de amostras analisadas, número e proporção de amostras positivas para RV do grupo A, por procedência (interno ou ambulatorial), ao longo dos anos, em Uberaba.....	49
Tabela 3: Número de amostras analisadas, número e proporção de amostras positivas para RV do grupo A, por procedência (interno ou ambulatorial), ao longo dos anos, em Uberlândia..	50
Tabela 4: Total de amostras analisadas e amostras positivas para RV do grupo A, de acordo com as faixas etárias, em Uberaba e Uberlândia.....	50
Tabela 5: Amostras analisadas e amostras positivas para RV do grupo A, de acordo com as faixas etárias, por ano, em Uberaba.....	50
Tabela 6: Amostras analisadas e amostras positivas para RV do grupo A, de acordo com as faixas etárias, por ano, em Uberlândia.....	51
Tabela 7: Distribuição das amostras analisadas e positivas para RV do grupo A, por faixa etária e procedência (internados ou ambulatoriais) da amostra.....	51
Tabela 8: Número de amostras analisadas de cada cidade e seus respectivos genótipos.....	60
Tabela 9: Amostras de RV do grupo A causadoras de diarreia em crianças elegíveis a vacinação.....	61
Tabela 10: Solução da reação de RT.	93
Tabela 11: Solução da reação de amplificação (PCR).....	94
Tabela 12: Solução da reação de genotipagem.....	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número total de óbitos de crianças com menos de cinco anos e número de mortes infantis por doenças diarréicas no Brasil, de 1990 a 2006.....	15
Figura 2: Microscopia eletrônica mostrando partículas de RV.....	17
Figura 3: Principais características da estrutura dos genes dos RV.....	18
Figura 4: EGPA mostrando os 11 segmentos do dsRNA que formam o genoma dos RV do Grupo A, localização das proteínas dos RV codificadas por cada um de seus segmentos e estrutura 3D da partícula.....	19
Figura 5: Estimativa global de distribuição de mortes anuais de crianças por diarreia causada por RV.....	26
Figura 6: Distribuição mundial dos genótipos G e P de RV humanos do grupo A.....	27
Figura 7: Taxas de identificação do genótipo G de RV do grupo A em períodos distintos, no Brasil.....	28
Figura 8: Padrão de migração dos 11 segmentos genômicos dos RV do grupo A, B e C.....	29
Figura 9: Estimativa dos agentes etiológicos de doença diarréica que requereu hospitalização em países desenvolvidos e em desenvolvimento.....	31
Figura 10: Esquema de caracterização do gene que codifica a proteína VP7 dos RV humanos (grupo A) por RT-PCR.....	43
Figura 11: Esquema de caracterização do gene que codifica a proteína VP7 dos RV animais (grupo A) por RT-PCR.....	43
Figura 12: Esquema de caracterização do gene que codifica a proteína VP4 dos RV humanos (grupo A) por RT-PCR.....	44
Figura 13: Esquema de caracterização do gene que codifica a proteína VP4 dos RV animais (grupo A) por RT-PCR.....	45
Figura 14: Distribuição das amostras diarréicas ao longo dos meses estudados em Uberaba..	48
Figura 15: Distribuição das amostras diarréicas ao longo dos meses estudados em Uberlândia.	48
Figura 16: Distribuição mensal de todas as amostras analisadas e positivas para RV do grupo A, na região do Triângulo Mineiro.....	52
Figura 17: EGPA de RV do grupo A extraídos a partir de duas amostras fecais, uma de eletroferotipo curto (C) e outro de eletroferotipo longo (L).....	53
Figura 18: Distribuição dos eletroferotipos longos e curtos ao longo do período estudado.....	54

Figura 19: EGPA de RV do grupo A extraídos a partir de amostras fecais, mostrando duas variantes de eletroferotipo curto, detectadas em 2007, 2008 ou 2010.....	55
Figura 20: EGPA de RV do grupo A extraídos a partir de amostras fecais, mostrando três variantes de eletroferotipo longo.....	56
Figura 21: EGPA de RV do grupo A extraídos a partir de amostras fecais, mostrando três amostras de RV de eletroferotipo curto, repetidas em géis diferentes.....	56
Figura 22: EGPA de RV do grupo A extraídos a partir de amostras fecais, mostrando duas amostras de RV de eletroferotipo longo, repetidas em géis diferentes.....	57
Figura 23: Porcentagem de detecção dos genótipos G em todo o período estudado.....	58
Figura 24: Gel de agarose 1%, mostrando os produtos amplificados após genotipagem do gene 9 de amostras de RV do grupo A, por RT-PCR.....	58
Figura 25: Porcentagem de detecção dos genótipos P em todo o período estudado.....	59
Figura 26: Gel de agarose 1%, mostrando os produtos amplificados após genotipagem do gene 4 de amostras de RV do grupo A, por RT-PCR.....	59
Figura 27: Porcentagem de detecção das combinações entre os genótipos G e P, em todo o período estudado.....	60

RESUMO

O rotavírus (RV) é o principal agente etiológico da diarreia aguda infantil; ele está associado a um grande número de hospitalizações e a 661.000 mortes anuais de crianças em países em desenvolvimento. Este vírus apresenta uma grande variabilidade antigênica; a partícula viral é formada por um capsídeo duplo cuja camada mais externa é composta pelas proteínas VP7 e VP4, as quais definem os genótipos G e P, respectivamente. No Brasil, desde 2006, uma vacina monovalente contra RV foi introduzida no programa nacional de imunização e dados sobre caracterização molecular de RV circulantes fora das maiores cidades brasileiras são escassos; assim, o objetivo deste estudo, foi detectar e caracterizar os RV nas fezes de crianças com diarreia, na região do Triângulo Mineiro, MG, entre abril de 2007 e julho de 2010. A detecção do vírus foi feita pela visualização do genoma viral em eletroforese em gel de poliacrilamida após extração do RNA a partir das fezes e a genotipagem das amostras positivas foi realizada através de RT-PCR. De 592 amostras analisadas, 74 (12,5%) foram positivas para RV do grupo A. A prevalência variou acentuadamente de um ano para outro, sendo verificada uma diminuição significativa em 2009 e uma tendência de aumento em 2010. A detecção do RV ocorreu predominantemente nos meses secos de inverno e foi maior em crianças internadas e na faixa etária entre 13 a 24 meses. Observou-se a circulação de diferentes variantes de eletroferotipo curto, que representaram 95,9% das amostras, e uma baixa circulação de RV de eletroferotipo longo (4,1%). RV do genótipo G2P[4] foram quase que exclusivamente os únicos encontrados. Nossos resultados contribuem para o entendimento da epidemiologia dos RV no País e fornecem subsídios para avaliações futuras sobre a adoção de medidas de controle e vacinação. Este estudo deve ser continuado para que possamos entender melhor o impacto da vacinação na epidemiologia dos RV na região do Triângulo Mineiro.

Palavras-chave: rotavírus, diarreia infantil, epidemiologia molecular

ABSTRACT

The rotavirus is the most important etiologic agent of acute diarrhea in children. It is associated with a large number of hospitalizations and 661,000 annual deaths of children in developing countries. This virus presents a great antigenic variability; the particle is formed by a double capsid whose outer layer is composed of proteins VP7 and VP4, which define the G genotypes, respectively. In Brazil, since 2006, a monovalent vaccine against rotavirus (G1P [8]) was introduced into the national immunization program and data on the molecular characterization of strains circulating outside the major cities in Brazil are scarce, so the aim of this study was to detect and characterize rotavirus in faeces from children with diarrhea in the Triangulo Mineiro region, Brazil, between April 2007 and July 2010. The detection of rotavirus was made by visualization of the viral genome in polyacrylamide gel electrophoresis after extraction of RNA from stool and genotyping of positive samples was performed by RT-PCR. Of 592 samples analyzed, 74 (12.5%) were positive for group A rotavirus. Prevalence varied significantly from one year to another, being verified a significant decrease in 2009 and an upward trend in 2010. The detection of rotavirus occurred predominantly in the dry months of winter and was higher in hospitalized children aged 13 to 24 months. We observed the circulation of different variants of short electropherotypes, characterizing 95.9% of positive samples, and a low circulation long electroferotypes (4.1%). Rotavirus of genotype G2P[4] were almost exclusively the only ones found. The results of our study contribute to understanding the epidemiology of rotavirus in Brazil and provide information for future evaluations of the adoption of control measures and vaccination. This study should be continued so that we can better understand the impact of vaccination on the epidemiology of rotavirus in the Triangulo Mineiro region.

Keywords: rotavirus, childhood diarrhea, molecular epidemiology

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A diarreia aguda infecciosa é um dos maiores problemas de saúde pública mundial, estando entre as principais causas de morbidade e mortalidade infantil (UNICEF, 2009). Em países em desenvolvimento, a diarreia infantil é uma importante causa de morbidade e a segunda causa mais importante de morte, ficando atrás somente das doenças respiratórias agudas (WHO, 2008). Estima-se que a diarreia seja responsável por cerca de 1,87 milhões de mortes anuais em todo o mundo (BOSCHI-PINTO; VELEBIT; SHIBUYA, 2008) e que, em média, cada criança sofra três episódios por ano (CHENG; MCDONALD; THIELMAN, 2005). Em países desenvolvidos a diarreia infecciosa também é responsável por um grande número de hospitalizações e consultas ambulatoriais e apresenta-se como uma doença de elevado custo econômico, porém estão menos associadas a casos de morte (CHENG; MCDONALD; THIELMAN, 2005; KOSEK; BERN; GUERRANT, 2003). O maior risco de morte enfrentado por crianças nos países em desenvolvimento acontece provavelmente como consequência de um estado de nutrição deficiente, de infecções co-existentes e da dificuldade de acesso aos serviços de atenção à saúde (MS, 2006).

No Brasil, no ano de 2004 foram notificados aproximadamente 2,4 milhões de casos de diarreia, sendo que destes, 1,2 milhões de casos ocorreram em crianças com até quatro anos de idade (MS, 2006). Apesar do número total de óbitos infantis ter diminuído de cerca de 114.000 em 1990 para 57.000 em 2006 (Figura 1), as doenças diarreicas ainda são um dos seus principais componentes, representando 12.317 (10,8%) mortes em 1990 e 2.236 (3,9%) em 2006 (MS, 2007).

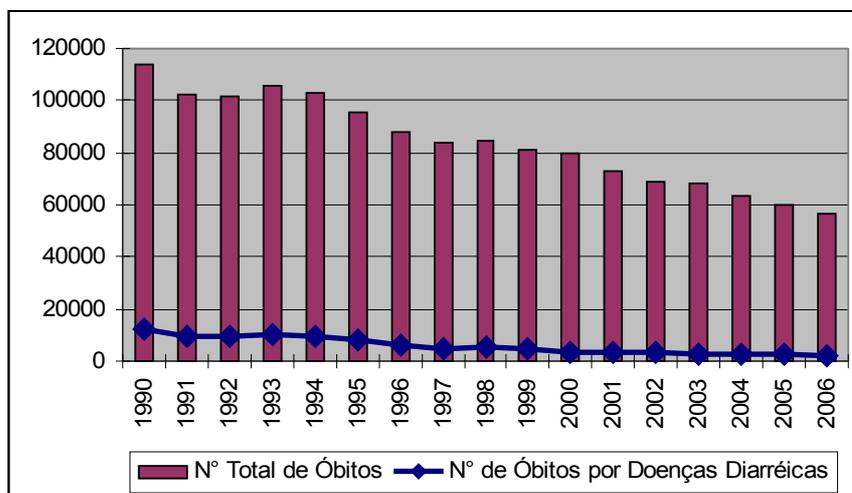


Figura 1: Número total de óbitos de crianças com menos de cinco anos e número de mortes infantis por doenças diarreicas no Brasil, de 1990 a 2006.

Fonte: (MS, 2007).

A magnitude das doenças diarréicas agudas infantis em nosso país também pode ser demonstrada pela quantidade de recursos destinados ao pagamento de internações hospitalares por estes agravos que no período de 1995 a 2004, somaram mais de 170 milhões de reais (MS, 2006); além dos custos diretos devido aos atendimentos médicos, temos que levar em consideração também os custos indiretos como a falta ao trabalho e à escola, gastos com medicamentos e transportes (IAL, 2004).

As doenças diarréicas agudas podem ser causadas por vírus, bactérias ou enteroparasitas, mas a maioria das diarréias que acometem crianças de até cinco anos, são causadas por agentes virais (ESTES; KAPIKIAN, 2007; CLARK; MCKENDRICK, 2004).

Os principais agentes virais causadores de diarréia são os Rotavírus (RV), os Calicivírus (GREEN, 2007) e outros agentes associados em menor proporção, como os Astrovírus (ARIAS, 2007) e Adenovírus (WOLD; HORWITZ, 2007).

O RV é o agente mais importante envolvido na etiologia das diarréias infecciosas infantis e segundo estimativas ele é responsável por aproximadamente 40% das internações por diarréia (CDC, 2008), estando associado à cerca 661.000 mortes de crianças com até cinco anos de idade, por ano, em países em desenvolvimento (PARASHAR, 2006).

1.1 Histórico

O RV foi associado à diarréia infantil pela primeira vez por Bishop et al. (1973) que através da técnica de microscopia eletrônica, observaram partículas virais no interior de vesículas citoplasmáticas em biópsias da mucosa duodenal de crianças com gastroenterite aguda; este patógeno foi inicialmente chamado de Orbivírus. Flewett et al. (1974) observaram a presença de uma camada protéica dupla na conformação estrutural do Orbivírus, passando o denominá-lo Duovírus; logo depois, este foi chamado de RV (derivado do latim “*Rota*”, que significa “roda”), devido ao aspecto radiado do patógeno (Figura 2). Após este período, vários estudos visando à detecção do vírus foram realizados em todo o mundo e ficou provado que o RV é o principal agente de diarréia severa em crianças com menos de cinco anos, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (ESTES; KAPIKIAN, 2007). No Brasil, o primeiro registro de RV associado à diarréia em crianças aconteceu em 1976, no Pará (LINHARES et al., 1977).

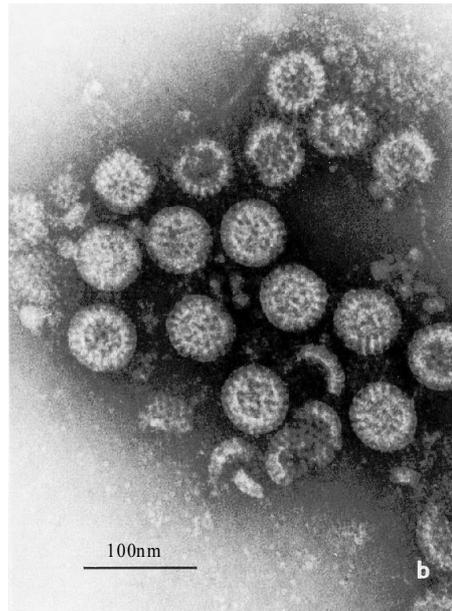


Figura 2: Microscopia eletrônica mostrando partículas de RV em aumento de 100.000 vezes.
 Fonte: <http://www.ictvdb.org/Images/Cornelia/rota61.htm>

1.2 Classificação e Estrutura

Os RV constituem um gênero da família *Reoviridae*. A partícula íntegra apresenta aproximadamente 70 nanômetros (nm) de diâmetro ou 100nm considerando-se as espículas virais. O vírion exibe uma estrutura icosaédrica, não possui envelope lipídico e é formado por um capsídeo com três camadas protéicas: uma interna que envolve o genoma viral (core), uma intermediária e uma externa (ESTES, 2001).

A família *Reoviridae* é constituída por 12 gêneros e inclui vírus que infectam mamíferos, pássaros, répteis, peixes, molúsculos, insetos, plantas, fungos e artrópodes. O genoma dos vírus é formado por 10, 11 ou 12 segmentos de RNA de fita dupla linear, cada um codificando de uma a três proteínas virais. Os virions maduros têm tamanhos que variam de 60 a 85nm (desconsiderando as projeções virais), não tem envelope lipídico e tem simetria icosaédrica. Apesar dessas semelhanças, os vírus de cada um dos gêneros, apresentam diferenças genéticas, estruturais e biológicas. Esta família pode ser dividida em dois grupos: um que apresenta projeções relativamente grandes situadas nos 12 vértices da estrutura icosaédrica, que incluem os gêneros *Orthoreovirus*, *Aquareovirus*, *Cypovirus*, *Idnoreovirus*, *Fijivirus*, *Oryzavirus* e *Mycoreovirus* e outro com o capsídeo mais liso ou quase esférico e sem grandes projeções nos eixos pentaméricos que inclui os gêneros *Rotavirus*, *Orbivirus*, *Coltivirus*, *Phytoreovirus* e *Seadornavirus* (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

O genoma dos RV do grupo A, é composto por 11 segmentos de ácido ribonucléico de fita dupla (dsRNA) que variam de 667 a 3302 pares de bases (pb), sendo numerados de

acordo com a ordem de migração em Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA). O tamanho completo do genoma é de aproximadamente 18550 pb, e cada um dos 11 segmentos representa pelo menos um gene (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Os segmentos começam com uma guanina na extremidade 5', seguida por uma sequência conservada de nucleotídeos, que são parte de uma região não codificadora dessa extremidade (Figura 3). Posteriormente encontra-se uma região aberta de leitura (RAL) com os códons de iniciação e parada da tradução e por fim, outra sequência não codificadora na extremidade 3', também conservada, que termina com uma citosina na extremidade 3', não poliadenilada. Alguns genes possuem uma segunda RAL em fase ou fora da fase, como por exemplo o gene 11 que codifica duas proteínas virais (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

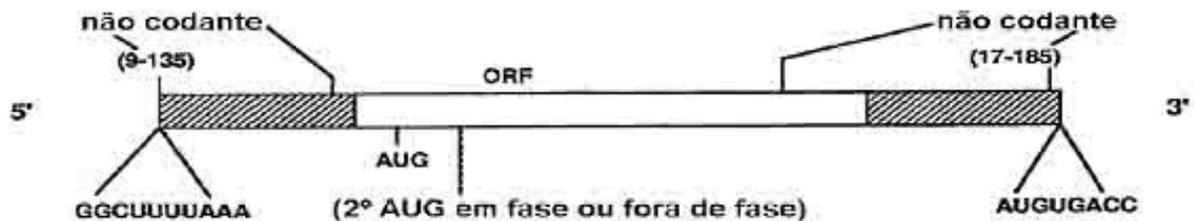


Figura 3: Principais características da estrutura dos genes dos RV. Nas extremidades 5'e 3' as regiões não codificadoras, indicando os nucleotídeos conservados (região achurada). Em branco a região codificadora.

Fonte: (Adaptado de ESTES; KAPIKIAN, 2007).

O genoma viral codifica a seis proteínas estruturais (VP) que formam o vírion (Figura 4) e a seis proteínas não estruturais (NSP), que participam da replicação do RV na célula hospedeira (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

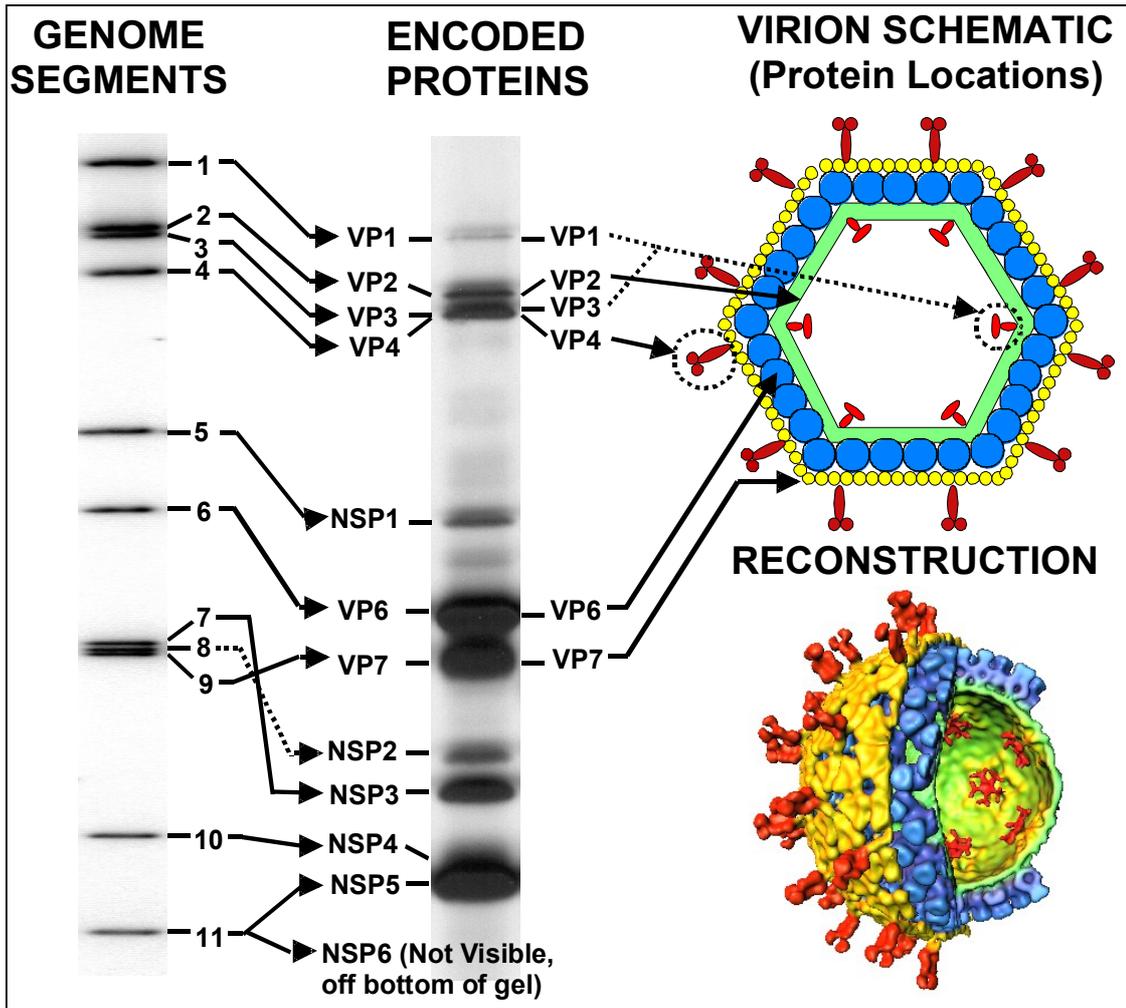


Figura 4: EGPA mostrando os 11 segmentos do dsRNA que formam o genoma dos RV do grupo A, localização das proteínas dos RV codificadas por cada um de seus segmentos e estrutura 3D da partícula.

Fonte: http://www.iah.bbsrc.ac.uk/dsRNA_virus_proteins/rotavirus%20figure.htm.

O capsídeo interno é formado pelas proteínas estruturais: VP1, VP2 e VP3. A VP1 (produto de gene 1) é a maior proteína estrutural, está associada ao RNA viral e tem como funções a atividade de RNA polimerase RNA dependente, capacidade de ligar-se ao RNA de fita simples (ssRNA) e formar um complexo com o proteína VP3. A VP2 (produto de gene 2) é a proteína mais abundante do *core* e é imunogênica. Ela também tem capacidade de ligar-se ao RNA viral e interage com a VP1, VP3 e VP6 formando partícula viral incompleta. Essas interações são críticas na replicação e transcrição do genoma viral. A VP3 (produto de gene 3) além de ligar-se ao RNA viral, apresenta atividade de guaniltransferase, metiltransferase e forma um complexo com VP1 (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A camada intermediária do capsídeo é formada pela proteína VP6 (produto de gene 6). Esta proteína interage com as proteínas VP4, VP7 e VP2, possui propriedade imunogênica e antigênica e é requerida para transcrição. Nesta proteína, situam-se determinantes antigênicos

responsáveis pela classificação dos RV em grupos (A-G). A proteína VP6 também é utilizada para classificar os RV do grupo A em relação ao subgrupo, sendo eles do tipo I, II, I e II e não I e não II; esta característica é pouco utilizada atualmente na classificação destes vírus. A maioria das técnicas utilizadas rotineiramente para diagnóstico laboratorial detecta a proteína VP6 do RV do grupo A (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A camada mais externa do capsídeo é formada pelas proteínas VP7 (produto de gene 7, 8 ou 9 dependendo da amostra) e VP4 (produto de gene 4). A VP7 é uma glicoproteína que induz a produção de anticorpos neutralizantes, por isso é utilizada para classificar os RV do grupo A em sorotipos e genótipos **G** (por tratar-se de uma **glicoproteína**). Os sorotipos G são determinados utilizando-se anticorpos monoclonais neutralizantes e os genótipos G por técnicas de genotipagem e seqüenciamento (GOUVEA et al., 1990a). Existe uma concordância de classificação entre a sorotipagem e a genotipagem para a proteína VP7. Até o momento já foram caracterizados pelo menos 22 genótipos e 15 sorotipos G, sendo 11 identificados em humanos (ABE et al., 2009; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A proteína VP4 é uma hemaglutinina, importante para ligação do vírus na célula e também induz a produção de anticorpos neutralizantes. Ela sofre ação da tripsina pancreática, gerando dois produtos, VP5* e VP8*, o que aumenta a infecciosidade viral. Como esta proteína induz anticorpos neutralizantes independentemente de VP7, ela é utilizada para classificar os RV do grupo A em relação aos sorotipos e genótipos **P** (por ser sensível a **protease**). Ao contrário da proteína VP7, anticorpos contra os diferentes tipos da proteína VP4 apresentam reações cruzadas, dificultando a classificação em sorotipos através de testes imunológicos; logo, utiliza-se comumente a classificação em genótipos P através de técnicas moleculares, sendo designados a letra P seguida de algarismo arábico entre colchetes (Ex: P[8]). Até o momento foram identificados 31 genótipos e 15 sorotipos P, sendo 11 detectados em humanos (ABE et al., 2009; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Baseado nas seqüências dos genes que codificam as proteínas VP7 e VP4, os RV do grupo A, são classificados através de um sistema binário, considerando os genótipos G e P, respectivamente (Ex: G1P[8]). No entanto, em 2008, houve uma nova proposta de classificação dos RV baseada na análise das seqüências dos 11 segmentos genômicos (MATTHIJNSSENS et al., 2008), porém talvez pelo alto custo da técnica do sequenciamento, esta classificação ainda não é amplamente utilizada.

A proteína NSP1 (produto do gene 5) é a maior proteína NS; possui um domínio do tipo dedo de zinco (característico de proteínas que se ligam a ácidos nucléicos). Além disso,

ela interage com o fator regulador 3 de interferon (IRF-3) degradando-o (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A NSP2 (produto do gene 7, 8 ou 9, dependendo da amostra) também tem a capacidade de se ligar a RNA, atua como uma nucleotídeo trifosfatase (NTPase) e helicase, essenciais para tradução e replicação do RV. Além disso, ela participa da formação das inclusões citoplasmáticas denominadas viroplasmas (ESTES; KAPIKIAN, 2007; EICHWALD; RODRIGUEZ; BURRONE, 2004).

A NSP3 (produto do gene 7, 8 ou 9, dependendo da amostra) prejudica a tradução de mRNA celulares, pois liga-se à porção 3' dos mRNA virais competindo com a proteína de ligação às caudas de poliA (PABP) da célula eucariótica, pela interação com os fatores eucarióticos de iniciação da tradução [eIF-4G1] (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A NSP4 (produto do gene 10) é inicialmente sintetizada como uma proteína transmembranar do retículo endoplasmático (RE) e depois processada nas formas intracelular (NSP4i) e extracelular (NSP4e), com funções distintas. A NSP4i promove um aumento de cálcio intracelular, necessário para a replicação do vírus. Além disso, liga-se à VP6 das partículas imaturas, facilitando o brotamento dessa partícula através da membrana do RE para adquirir as proteínas do capsídeo externo VP4 e VP7, tornando-se uma partícula madura. A NSP4i também migra para membrana plasmática, onde é clivada por uma protease, gerando a NSP4e, que atua como uma enterotoxina, tendo um importante papel na patogênese viral (HYSER; ESTES, 2009).

As duas últimas proteínas NSP5 e NSP6 são codificadas em duas ORFs diferentes do segmento 11. NSP5 é uma proteína fosforilada e glicosilada que atua como cinase e pode ligar-se ao RNA. Junto NSP2, forma o viroplasma, interagindo com VP2 e NSP6. A NSP6 também é fosforilada, interagindo com NSP5 sendo encontrada no viroplasma (ESTES; KAPIKIAN, 2007; EICHWALD; RODRIGUEZ; BURRONE, 2004).

1.3 Replicação viral

A replicação dos RV ocorre no citoplasma de enterócitos diferenciados e segundo Estes, Kapikian (2007) segue as seguintes etapas:

- a) O vírus sofre adsorção através da interação das proteínas VP7 e VP4 com a superfície celular e penetra na célula hospedeira. Esta internalização parece ser dependente da clivagem da proteína VP4, já que estudos mostram que a infecciosidade dos RV *in vitro* é aumentada pela adição de tripsina;

- b) No citoplasma da célula a partícula íntegra perde a camada externa (VP4 e VP7). Assim a RNA polimerase viral inicia a transcrição dos genes a partir da fita de polaridade negativa sintetizando os RNAs mensageiros (mRNA), que estão sempre associados a proteínas virais, nunca circulando livres no citoplasma;
- c) Os mRNA são traduzidos nas proteínas estruturais e não-estruturais e também servem de molde para síntese da fita de polaridade negativa, que permanece unida à fita de polaridade positiva, formando o dsRNA. As proteínas ligadas ao dsRNA acumulam-se no citoplasma em regiões denominadas viroplasmas, onde dão origem a partículas sub-virais que, por sua vez, ampliam o processo de replicação viral;
- d) As partículas sub-virais brotam para o interior do RE através da interação com a NSP4, adquirindo um envelope lipídico transitório. Este envelope é substituído pela camada protéica externa (VP7 e VP4), tornando a partícula madura;
- e) As partículas virais maduras são liberadas por lise celular.

1.4 Transmissão e patogênese

Os RV são transmitidos pela via fecal-oral, de pessoa para pessoa e pela ingestão de água, alimentos ou objetos contaminados. Os vírus replicam-se nos enterócitos do intestino delgado, principalmente no jejuno, resultando na liberação de aproximadamente 10^{10} partículas infecciosas por mililitro de fezes. A dose infectante é de 10 partículas infecciosas/mL e os RV são muito estáveis em condições adversas no ambiente (BISHOP, 1996).

O intestino delgado é formado pelas vilosidades intestinais e depressões denominadas criptas de Lieberkühn, que ficam entre essas vilosidades sendo recoberto por células caliciformes que secretam muco e por enterócitos, que, na cripta, secretam grande quantidade de água e eletrólitos. Nas vilosidades, os enterócitos absorvem água, eletrólitos e sintetizam dissacaridases, peptidases e outras enzimas com função digestiva (GUYTON; HALL, 2006). A atividade dos enterócitos na cripta e nas vilosidades resulta em um fluxo constante de água e eletrólitos através do epitélio intestinal (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Já foram propostos três mecanismos fisiopatológicos da diarreia causada por RV. O primeiro ocorre devido a danos no epitélio intestinal, que comprometem a absorção de água e eletrólitos e a síntese de dissacaridases. Estudos histológicos e ultraestruturais envolvendo modelos animais e biópsias de intestino de humanos mostram o desenvolvimento das seguintes lesões: achatamento e atrofia das vilosidades, infiltração de células mononucleares na lâmina própria, distensão das cisternas do RE, dilatação da mitocôndria e microvilosidades

esparças e irregulares (GREEN; CHANOCK, KAPIKIAN, 2001). O segundo mecanismo propõe o envolvimento do sistema nervoso autônomo, que promove a liberação de citocinas, aumentando a secreção de água e eletrólitos (LINHARES; ARAÚJO; JUSTINO, 2005). E o último está relacionado à proteína NSP4. Estudos experimentais realizados por Ball et al. (1996) mostraram que a NSP4 age como uma enterotoxina desencadeando diarreia na vigência de infecção por RV. A NSP4 se liga as integrinas ($\alpha1\beta1$ e $\alpha2\beta1$) das células vizinhas, ativando a fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e fosfolipase C (PLC). As consequências da ativação de PI3K ainda são desconhecidas, mas a ativação de PLC resulta na produção de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e liberação de cálcio mediado pelo receptor IP_3 . O aumento de cálcio ativa a secreção de cloreto, dependente da idade, resultando em diarreia em camundongos neonatos (HYSER; ESTES, 2009).

Alguns estudos em modelos animais mostram que os RV têm uma propagação e replicação extra-intestinal (CRAWFORD et al., 2006; FENEUX et al., 2006; AZEVEDO et al., 2005). Em estudos sobre a infecção em humanos o vírus também foi detectado fora do trato gastrointestinal, porém seus efeitos ainda não estão bem elucidados (BLUTT et al., 2007).

1.5 Características clínicas e tratamento

A infecção por RV pode ser assintomática ou sintomática. Os quadros assintomáticos são mais comuns nos primeiros meses de vida; acredita-se que este fato ocorra devido a transferência passiva de anticorpos da mãe para o filho, infecções por cepas atenuadas e imaturidade intestinal (ESTES; KAPIKIAN, 2007). O quadro sintomático é caracterizado por um período de incubação de um a três dias e os sintomas mais comuns são a diarreia, vômito e febre. A diarreia tem duração de três a oito dias; normalmente as fezes são líquidas, com aspecto gorduroso e com ausência de sangue. O vômito ocorre numa frequência muito maior se comparado com as gastroenterites por outras etiologias e a febre é normalmente moderada. Bebês prematuros, crianças de 6 a 24 meses, idosos e indivíduos imunodeficientes são mais propensos a apresentar sintomas severos, tais como desidratação, mucosa seca, taquipnéia e letargia. A desnutrição é particularmente importante, aumentando a gravidade das manifestações clínicas; nestes casos, se o fluido e metabólitos perdidos não forem rapidamente restituídos, a doença pode evoluir e levar à morte. A excreção do vírus nas fezes se inicia antes mesmo do aparecimento dos sintomas clínicos, tem um pico entre 72 e 96 horas e continua entre 8 a 10 dias, após a remissão dos sintomas (LINHARES; ARAÚJO; JUSTINO, 2005).

A gastroenterite por RV é uma doença autolimitada. A principal complicação da gastroenterite é a desidratação. Crianças com menos de seis meses de idade e com anormalidades anatômicas do intestino apresentam um maior risco de desidratação. Os sinais para identificar a desidratação são: diminuição da perfusão periférica, elasticidade anormal da pele e padrões respiratórios anormais. As crianças que requerem hospitalização são aquelas que apresentam desidratação severa (perda > 7% do peso), crianças, as quais, os responsáveis não estão aptos a cuidar em casa e aquelas com uma co-morbidade associada como diabetes e doenças congênitas do coração (WEBB; STARR, 2005; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

O tratamento indicado é a reidratação oral e/ou parenteral, quando necessário, para a reposição de eletrólitos, evitando desta forma as complicações (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

1.6 Imunidade

Os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de imunidade contra infecções por RV ainda não são bem conhecidos. No entanto, há evidências de que o caráter protetor é conferido por anticorpos sistêmicos, anticorpos produzidos pela mucosa intestinal e a imunidade celular (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Estudos prospectivos demonstraram que o primeiro episódio de diarreia pelo vírus, produz sintomas clínicos mais graves do que em infecções subseqüentes, mostrando um caráter protetor natural à re-infecções (BISHOP et al., 1983; VELÁZQUEZ et al., 1996; WARD et al., 1996).

Estudos experimentais em animais demonstraram o caráter protetor das imunoglobulinas IgG e IgA e anticorpos neutralizantes específicos para as proteínas VP4 e VP7 (WARD et al., 1996; MALIK et al., 2008). Ball et al. (1996) acrescentam aos determinantes da resposta imune, anticorpos específicos contra a proteína NSP4.

Existem controvérsias sobre o papel das citocinas interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na infecção por RV (WARD et al., 1996). Em um estudo realizado por Malik et al. (2008) observou-se um aumento significativo de IFN- γ frente a infecção pelo vírus. A resposta IFN- γ foi transitória e significativamente maior em adultos que em crianças com exposição prévia e uma resposta ainda menor em crianças que não tiveram exposição prévia, sugerindo um acúmulo gradual de células T de memória específicas contra o RV com infecções repetidas.

1.7 Diagnóstico laboratorial e caracterização viral

Exames laboratoriais são fundamentais para determinar o diagnóstico etiológico de doença diarreica aguda por RV, evitando assim uma antibioticoterapia indevida. O vírus é excretado em grandes quantidades nas fezes, mas os primeiros quatro dias da doença representam o período ideal para a coleta da amostra de fezes. Entre os procedimentos laboratoriais empregados, destacam-se: a aglutinação em partículas de látex e o ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), que detectam o antígeno comum de grupo VP6. Para o estudo e a caracterização do vírus, outras técnicas são empregadas, mais comumente em laboratórios de pesquisa, tais como a microscopia eletrônica, o isolamento viral em culturas de linhagens celulares, EGPA, reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa do RNA (RT-PCR), ensaios de microarranjos e seqüenciamento genômico (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

1.8 Epidemiologia

Segundo Parashar et al. (2003) a rotavirose é a principal causa de morbi-mortalidade por diarreia em crianças em todo o mundo. Estes autores revisaram estudos publicados entre 1986 a 1999 e observaram que os RV foram responsáveis por 111 milhões de episódios de diarreia por ano em crianças menores de cinco anos. Destes, cerca de 25 milhões levaram a consultas ambulatoriais; dois milhões a hospitalizações e a 592 mil óbitos. Parashar et al. (2006) fizeram outro estudo semelhante ao anterior e notaram um aumento na porcentagem de hospitalização por diarreia causada por RV de aproximadamente 22%, para 39%, entre os anos de 2000 a 2004. Além disso, a média de morte anual por diarreia foi estimada em 661.000 mortes. Mais de 80% dos óbitos por RV são registrados nos países mais pobres do mundo (Figura 5).

RV causam infecções em humanos e em muitas espécies de animais no mundo inteiro. Pessoas de todas as idades são susceptíveis, mas a prevalência é maior em crianças com até cinco anos de idade, principalmente pelo RV do grupo A. A doença é conhecida por ter um caráter “democrático”, pois leva a altos índices de morbidade em crianças com até três anos, tanto em países desenvolvidos, quanto em países em desenvolvimento (LINHARES; ARAÚJO; JUSTINO, 2005). Estudos sorológicos indicam que aos três anos de vida 95% das crianças já se infectaram por RV (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

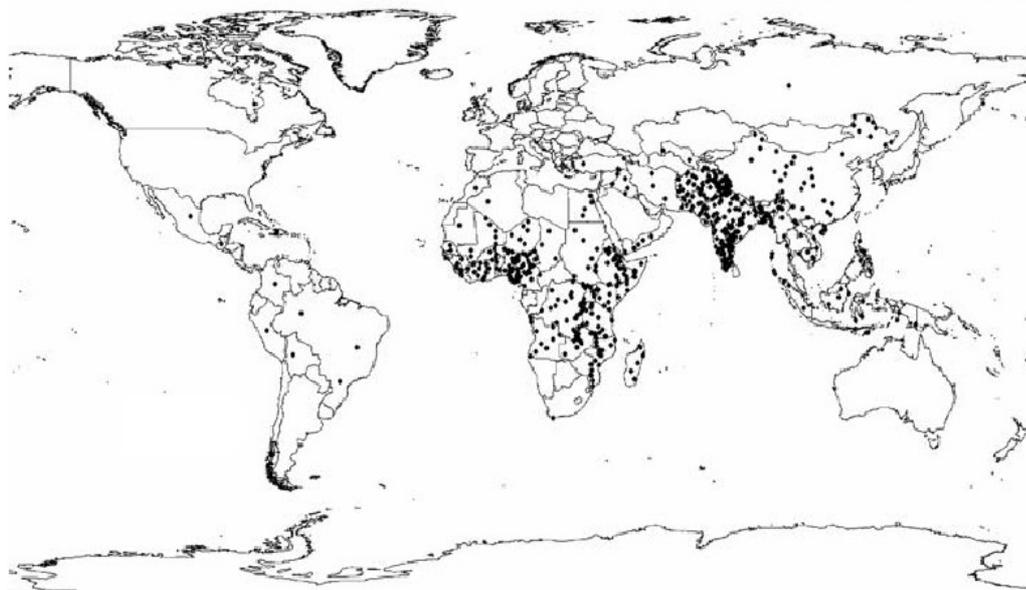


Figura 5: Estimativa global de distribuição de mortes anuais de crianças por diarreia causada por RV. Cada ponto representa mil mortes.

Fonte: (PARASHAR et al., 2006).

Os RV do grupo B são responsáveis por epidemias e acometem todas as faixas etárias, mas principalmente adultos chineses (SANEKATA et al., 2003).

Os RV do grupo C foram primeiramente reconhecidos em suínos e posteriormente como patógenos humanos por Bridger, Pedley & McCrae (1986); estão associados à ambos surtos de diarreia (VON BONSDORF; SVENSSON, 1988; GABBAY et al., 1989) e casos esporádicos de doença diarreica em vários países do mundo (PENARANDA et al., 1989; USHIJIMA et al., 1989; OISHI et al., 1993; RASOOL et al., 1994; JIANG et al., 1995).

Em estudos realizados no ambiente hospitalar, a incidência de infecção por RV é maior que no âmbito ambulatorial (LINHARES; ARAÚJO; JUSTINO, 2005). Um estudo realizado por Kane et al. (2004) mostrando a epidemiologia do RV na América Latina antes da introdução da vacina, observou uma prevalência de RV variando de 16% a 52% em pacientes internados e 4% a 42% em pacientes ambulatoriais. A idade de distribuição da infecção pelo vírus foi variável entre os países, mas 65%-85% das crianças foram hospitalizadas no primeiro ano de vida.

Os RV são também patógenos importantes de infecção nosocomial (ESTES; KAPIKIAN, 2007) e a adoção de medidas como lavagem das mãos reduz consideravelmente a prevalência da infecção no ambiente hospitalar (WAISBOURD-ZINMAN et al., 2010).

Em países de clima temperado os RV exibem um padrão sazonal de infecção, com picos ocorrendo durante os meses mais frios. Já naqueles de clima tropical, geralmente a

ocorrência da infecção por RV é observada durante todo o ano e esta transmissão contínua parece favorecer a maior diversidade de RV circulantes observada nos países tropicais em desenvolvimento (GOUVEA; SANTOS, 1997).

Os RV de genótipos G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] são os de maior circulação mundial (GENTSCH et al., 2005). Segundo o estudo de revisão realizado por Santos & Hoshino (2005) com trabalhos publicados entre 1989 e 2004, realizados em 52 países dos 5 continentes, estes genótipos representaram 88,5% das amostras de RV analisadas (Figura 6). Observando os cinco continentes separadamente, ocorrem grandes diferenças entre as prevalências de cada genótipo. O genótipo G1P[8], por exemplo, representava cerca de 70% das amostras de RV associadas à diarreia na América do Norte, Europa e Austrália, mas somente 30% dos casos na América do Sul e Ásia e 23% dos casos na África. Além disso, em algumas regiões, outros genótipos foram epidemiologicamente importantes, como na África, onde G8 representou 12,8% dos genótipos G e P[6], 29,4% dos genótipos P. O genótipo G5 foi detectado somente na América do Sul e África. Enquanto o G9 foi o terceiro genótipo mais prevalente na Austrália. Além disso, combinações incomuns entre genótipos G e P representaram 4,9% de todas as amostras estudadas.

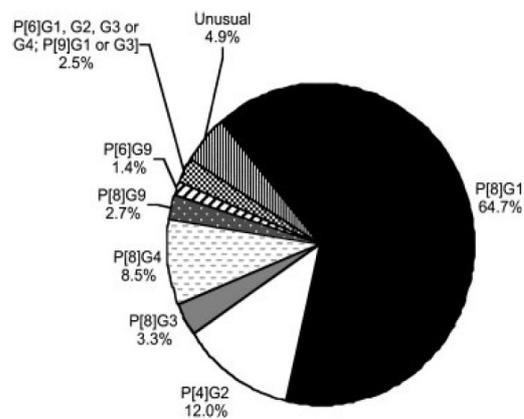


Figura 6: Distribuição mundial dos genótipos G e P de RV humanos do grupo A.
Fonte: (SANTOS; HOSHINO, 2005).

1.8.1 Epidemiologia no Brasil

Sartori et al. (2008) estimaram os índices de morbidade e mortalidade de crianças menores de 5 anos, com diarreia por RV no Brasil. Revisando estudos publicados entre 1999 a 2006 e identificaram que os RV causaram 3.525.053 episódios de diarreia, desses 655.853 levaram a consultas ambulatoriais, 92.453 a hospitalizações e 850 óbitos por ano.

A distribuição temporal das infecções por RV no Brasil assume peculiaridades; nas regiões Norte e Nordeste as infecções ocorrem ao longo do ano todo sem picos de incidência, já nas regiões Centro Oeste, Sudeste e Sul é nítido o padrão sazonal, onde são relatados picos de incidência nos meses frios (LINHARES; ARAÚJO; JUSTINO, 2005).

Leite, Carvalho-Costa & Linhares (2008) revisaram 42 artigos que detectaram e genotiparam RV do grupo A em amostras de fezes de 1982-2007 (Figura 7). Eles dividiram a era da pré-vacinação em dois importantes períodos: 1982-1995, no qual o genótipo G5P[8] foi detectado em 9% das fezes analisadas e quase que exclusivamente neste período e de 1996-2005 observou-se uma emergência do genótipo G9P[8], que apresentou uma prevalência de 27%. Além disso, ainda foram detectados os genótipos clássicos G1 em 43% das amostras, G2 em 9%, G3 em 6% e o G4 em 4% das amostras analisadas. O G2P[4] foi detectado em 37% das amostras de 1982 a 1995 e somente em 2% das amostras de 1996 a 2005. No entanto, no período pós-vacinação, o genótipo G2P[4] foi detectado em 74% das amostras analisadas.

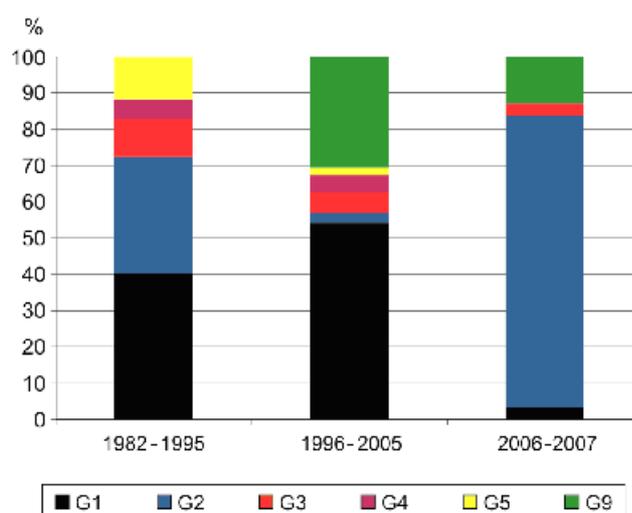


Figura 7: Taxas de identificação do genótipo G de RV do grupo A em períodos distintos, no Brasil.

Fonte: (LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES, 2008).

1.8.2 Eletroferotipos de RV

Os RV possuem 11 segmentos de dsRNA que são facilmente separados de acordo com seus tamanhos quando submetidos à EGPA. Estes segmentos são distribuídos em quatro classes, as quais são numeradas de acordo com a ordem de migração no gel de poliácridamida (Figura 8). Para os RV do grupo A, a primeira (classe I) é formada por quatro segmentos (numerados de 1-4) de 3302 a 2362 pb; a segunda (classe II) por dois segmentos (5 e 6) de 1581 e 1356 pb; a terceira (classe III) por três segmentos (7 a 9) de 1104 a 1062 pb e a última

(classe IV) por dois ainda menores (10 e 11) de 751 a 667 pb. Assim, observa-se a distribuição 4,2,3,2, podendo ser distinguida dos RV dos grupos B e C, que possuem padrões de migração 4,2,2,3 e 4,3,2,2, respectivamente. Baseando-se, nas diferenças ou semelhanças observadas no perfil de migração dos segmentos genômicos, classificamos os RV quanto aos seus eletroferotipos, o que nos auxilia na caracterização destes vírus (ESTES; KAPIKIAN, 2007, DOMINGUES et al., 2000; HOLMES, 1996).

De acordo com o padrão de migração dos segmentos 10 e 11 a amostra pode ser classificada como de padrão “longo” (migração rápida), de padrão “curto” (migração lenta) e menos frequentemente de padrão “supercurto” com migração mais lenta (Figura 8). Apesar de não existir uma relação definitiva entre os eletroferotipos e os diferentes genótipos de RV, as amostras de eletroferotipo “longo” normalmente estão relacionadas a amostras humanas do subgrupo II e os genótipos G1, G3, G4 e G9, P[6] e P[8]. Aquelas de padrão “curto”, geralmente estão associadas ao subgrupo I e genótipos G2, P[4] P[6] e as de padrão “super curto” ao subgrupo I e genótipo G8 (GREEN; CHANOCK, KAPIKIAN, 2001). Nos vírus de padrão curto, a polimerase viral faz uma duplicação parcial do segmento onze, que tem seu tamanho aumentado, fazendo com que este migre anteriormente ao segmento dez. É importante lembrar que vírus do mesmo grupo, subgrupo, genótipo, podem apresentar eletroferotipos diferentes e que RV do mesmo eletroferotipo podem ser de genótipos diferentes (GOUVEA; SANTOS, 1997; GOUVEA et al., 1990b).

		A			B					C		
		Human Wa	Human DS-1	Human 69M	Human ADRV HNR	Porcine Ohio	Bovine D531	Ovine E1101	Rat IDR	Human TG	Porcine Cowden	Bovine Shintoku
Classe I	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Classe II	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Classe III	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Classe IV	10	—	10	10	—	—	—	—	—	—	—	—
	11	—	11	11	—	—	—	—	—	—	—	—
		L	C	C	—	—	—	—	—	—	—	—

Figura 8: Padrão de migração dos 11 segmentos genômicos dos RV do grupo A, B e C. L – amostra com eletroferotipo de padrão longo; C – amostra com eletroferotipo de padrão curto. *Human* - RV humano; *Porcine* -RV de porco; *Bovine* - RV de boi; *Ovine* - RV de ovino; *Rat* - RV de rato.

Fonte: (Adaptado de GREEN; CHANOCK; KAPIKIAN, 2001).

Estudos baseados na EGPA ajudaram a entender aspectos importantes da epidemiologia dos RV. Entre eles: a diversidade e co-circulação de diferentes tipos de vírus; a detecção de infecções mistas; o predomínio de um tipo de RV em um determinado local e depois a mudança deste tipo e o surgimento de um novo tipo (ESTES; KAPIKIAN, 2007, DOMINGUES et al., 2000; HOLMES, 1996; GOUVEA; SANTOS, 1997; GOUVEA et al., 1990b).

1.8.3 Variabilidade genética e evolução dos RV

Os RV são caracterizados por apresentarem um alto potencial de variabilidade genética. Essa variação pode ser causada por mutações pontuais, rearranjo, reagrupamento ou recombinação dos segmentos genômicos (RAMIG, 1997).

A enzima RNA polimerase RNA dependente não possui atividade de reparo como a DNA polimerase, portanto o processo de replicação do vírus está propenso a erros, o que permite a ocorrência de mutações (GOUVEA; BRANTLY, 1995). As mutações pontuais diferenciam linhagens e sub-linhagens dentro de um mesmo genótipo (ITURRIZA-GOMARA et al., 2000).

Os rearranjos acontecem devido a deleções ou duplicações parciais de algumas regiões dentro de um segmento genômico do RV (DESSELBERGER, 1996). O vírus rearranjado quando visualizado em EGPA apresenta ausência de alguns dos segmentos na posição original e/ou aparecimento de bandas adicionais com mobilidades diferentes (RAMIG, 1997).

Os reagrupamentos podem ocorrer durante infecções duplas nos hospedeiros, por recombinação entre segmentos de tipos diferentes de RV humanos ou entre segmentos de RV humanos e de espécies animais. A transferência de genes é particularmente importante quando esses genes codificam antígenos biologicamente importantes, como antígenos de neutralização e determinantes de virulência (RAMIG, 1997; MATSUNO et al. 1980; MAUNULA; VON BONSDORFF, 2002).

A recombinação genética tem sido descrita como um importante mecanismo de geração de variabilidade, mas são poucos os relatos de sua ocorrência. A ocorrência de infecções mistas relatadas em vários estudos favorece os mecanismos de reagrupamento e recombinação (WOROBAY; HOLMES, 1999).

Os RV já foram identificados em várias espécies de animais. O fato de o genótipo G3 ser encontrado em humanos, assim como em muitos animais domésticos, levou os pesquisadores a levantarem a hipótese de ocorrência de transmissão interespecie. Ficou

provado ser possível ocorrer essa transmissão, através da técnica de hibridização RNA-RNA (NAKAGOMI et al., 1989). Esta técnica permite avaliar a similaridade entre as sequências nucleotídicas dos 11 segmentos de RNA, classificando os RV em genogrupos.

1.9 Prevenção e controle

Estudos epidemiológicos mostram uma semelhança nas taxas de incidência de gastroenterite por RV nos países desenvolvidos e nos países em desenvolvimento (Figura 9); sugerindo que a incidência desta infecção não pode ser diminuída apenas com suprimento de água tratada, saneamento básico e medidas de higiene, como acontece para outros agentes de gastroenterites, mas sim, com o uso de uma vacina efetiva (BISHOP, 1993; LINHARES, 1997).

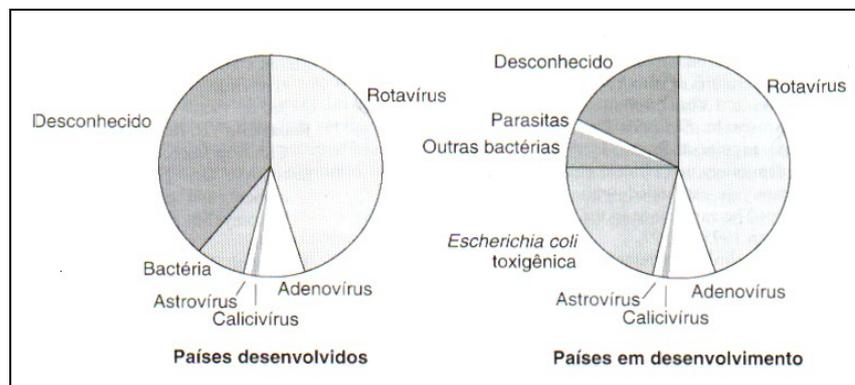


Figura 9: Estimativa dos agentes etiológicos de doença diarréica que requereu hospitalização em países desenvolvidos e em desenvolvimento.

Fonte: (KAPIKIAN, 1993).

Desde a década de 1980 vacinas contra os RV vêm sendo pesquisadas, mas a primeira vacina utilizada para uso humano foi licenciada nos Estados Unidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*), em 1998. Era uma vacina tetravalente recombinante de origem símia e humana, denominada comercialmente de Rotashield®. Nessa vacina, a amostra RRV “MMU 18006”, de origem símia atenuada com especificidade G3, foi geneticamente associada a três outras amostras de origem humana, com especificidade para G1, G2 e G4, respectivamente (LINHARES; ARAÚJO; JUSTINO, 2005).

Cerca de um ano após o início de sua utilização nos Estados Unidos, foram relatados 15 casos de invaginação intestinal em crianças vacinadas e o CDC (1999) suspendeu a utilização da vacina.

Duas novas vacinas (Rotateq™ - *Merck Research Laboratories* e Rotarix™ - *GlaxoSmithKline Biologicals*) foram desenvolvidas e licenciadas recentemente para uso em vários países (HYSER; ESTES, 2009).

A Rotateq™ é uma vacina oral atenuada pentavalente, licenciada nos EUA e na Europa, é baseada em rearranjo humano-bovino (cepa WC3). A cepa WC3 é naturalmente atenuada para humanos, porém não proporciona proteção cruzada ampla, assim é necessária a administração de três doses, para imunizar a criança. A vacina contém os vírus dos genótipos G1, G2, G3, G4 e P[8] e apresenta uma eficácia de 98% contra as formas graves de gastroenterite por RV (HYSER; ESTES, 2009), apesar de ter sido relatada eficácia menor (média de 43,8%) em países em desenvolvimento (ZAMAN et al., 2010, ARMAH et al., 2010).

A vacina Rotarix™ também de administração oral, é derivada de uma cepa de RV humano (G1P[8]), atenuada. Foi licenciada na Europa, EUA, México e em alguns países do Oriente Médio, África, Ásia e América Latina. No Brasil ela foi implantada no Calendário Básico de Imunização para Criança em março de 2006. Ela é administrada em duas doses a primeira aos dois meses e a segunda aos quatro meses de idade. Estudos mostram que a proteção contra diarreia severa causada por RV varia de cerca 79% a 90,4%. A vacina contra o RV além de proteger contra infecções graves pelo genótipo G1P[8], também desencadeia uma importante imunidade contra os outros genótipos G associados ao P[8]. No entanto, a sua eficiência contra o genótipo G2P[4] ainda não está bem definida (VESIKARI et al., 2004; SALINAS et al., 2005; RUIZ-PALACIOS et al., 2006, VESIKARI et al., 2007; LINHARES et al., 2008).

2 JUSTIFICATIVA

As diarreias infecciosas representam um dos principais problemas de saúde pública mundial, estando posicionadas como a segunda causa mais freqüente de morte em crianças com menos de cinco anos, e tendo o RV como o principal agente etiológico. Os RV são responsáveis por altas taxas de morbidade de crianças em todo o mundo e mortalidade de crianças em países desenvolvimento (UNICEF, 2009; WHO, 2008; CHENG; MCDONALD; THIELMAN, 2005; KOSEK; BERN; GUERRANT, 2003).

Os principais genótipos de RV circulantes são G1, G3, G4 e G9 associados ao P[8] e G2 associado ao P[4], mas devido à grande capacidade desses vírus em sofrer variações antigênicas, novos genótipos e diferentes combinações podem emergir e predominar ao longo do tempo em uma determinada região (LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES, 2008; RAMIG,1997). Trabalhos sobre a caracterização molecular dos RV fora das capitais brasileiras são escassos; criando uma dificuldade na definição do perfil dos vírus existentes em todo o Brasil.

Visando minimizar as complicações decorrentes da infecção, em 2006, o Governo Federal introduziu a vacina contra o RV no Calendário Básico de Imunização para a Criança. Segundo alguns autores a capacidade natural dos RV de variarem antigenicamente, associado à pressão imunológica exercida pela vacina pode favorecer o aparecimento de novas amostras, podendo haver uma mudança no padrão e na distribuição dos RV mais comuns (MATTHIJNSSENS et al., 2009; GENTSCH; PARASHAR; GLASS, 2009).

Investigações contínuas e abrangentes sobre os vírus circulantes em uma determinada região ou novas combinações de genótipos G/P que possam emergir através do tempo são importantes para entendimento dos aspectos envolvidos na biologia e epidemiologia dos RV; contribuindo para a avaliação da eficiência de vacinas e ajudando no estabelecimento de políticas de vigilância, tratamento e profilaxia das diarreias infecciosas.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar os RV do grupo A detectados em amostras fecais de crianças com suspeita clínica de gastroenterite viral, em Uberaba e Uberlândia, e analisá-las em associação aos aspectos epidemiológicos evidenciados nos casos estudados.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar a frequência da infecção por RV do grupo A na amostra estudada;
2. Caracterizar os RV do grupo A detectados nas fezes, quanto aos seus eletroferotipos, através da EGPA;
3. Identificar os genótipos G e P das amostras circulantes, através da RT-PCR;
4. Correlacionar os dados da caracterização viral à idade das crianças, procedência e ao período de coleta das amostras.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 População do estudo e amostras

A população foi composta por crianças com idade entre zero e dez anos, que apresentavam sintomas clínicos de diarreia aguda infecciosa, das quais foi solicitada a pesquisa de RV pelos médicos. Foram analisadas amostras dos períodos de 2007 a 2009, em Uberaba e de 2008 a 2010 em Uberlândia.

Para a coleta das amostras clínicas, nosso projeto contou com a colaboração de dois laboratórios de diagnóstico clínico: O Laboratório Jorge Furtado (JF), de Uberaba, e o Laboratório IPAC Medicina Diagnóstica (IPAC), de Uberlândia. Estes laboratórios realizam rotineiramente o diagnóstico da infecção pelo RV através do teste de aglutinação em partículas de látex (teste do látex) em amostras provenientes de crianças atendidas em clínicas particulares e em ambulatórios e enfermarias de hospitais públicos e privados. As amostras fecais foram colhidas, analisadas, armazenadas a 4°C até o momento do transporte ao laboratório da Disciplina de Microbiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), onde foram devidamente registradas, rotuladas e estocadas a -20°C, até o processamento. Juntamente com as amostras, foram enviados dados de data da coleta, idade e resultado do teste do látex. Este trabalho foi aprovado no Comitê de Ética da UFTM número do protocolo 672 (ANEXO I).

4.2 Detecção de Rotavírus nas amostras fecais

Para alcançarmos o primeiro objetivo, as amostras fecais (positivas e negativas pelo teste do látex) foram submetidas à extração do RNA viral e à EGPA, com base nos protocolos descritos abaixo:

4.2.1 Extração de ácido nucléico a partir das amostras fecais

As amostras fecais foram submetidas à extração de ácido nucléico pelo método de Boom et al. (1990), baseado nas propriedades de lise celular e de inativação de nucleases apresentadas pelo isotiocianato de guanidina (GITC) e também na propriedade de ligação aos ácidos nucléicos apresentada pelas partículas de sílica.

Em microtubos estéreis, as fezes foram diluídas a 20% em tampão fosfato salina (PBS) 1x (o modo de preparo de todas as soluções foi descrito no ANEXO II), liberando partículas de RV presentes no material fecal para o meio aquoso. Os restos fecais foram sedimentados por centrifugação a 12000g, por 15 minutos (min) e o sobrenadante foi utilizado. Em um novo

tubo, foram adicionados 900µL do tampão L6, 100µL do sobrenadante e 20µL de sílica. O tubo foi então homogeneizado em agitador (do tipo “vórtex”) por 15 segundos (s) e deixado em repouso por 10 min. Logo após, foi feita nova homogeneização em agitador e centrifugação por 5 s a 12000g. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento (partículas de sílica contendo o RNA ligado) foi lavado com tampão L2: foram adicionados 500µL de tampão L2 e o tubo foi levado ao agitador para que as partículas de sílica fossem ressuspensas; logo após, o tubo foi novamente centrifugado por 5 s a 12000g e o sobrenadante foi desprezado. Esta lavagem foi repetida mais uma vez (duas vezes no total). Na próxima etapa, procedeu-se à lavagem do sedimento com 500µL de solução de etanol gelado a 70% (duas vezes), seguido de outra com 500µL de acetona gelada (uma vez), repetindo-se os processos de ressuspensão, centrifugação e descarte do sobrenadante em cada lavagem. Após a lavagem com acetona, o tubo foi incubado a 56°C por 5 minutos com a tampa aberta, para a evaporação da acetona residual no sedimento. Por último, para a eluição do RNA viral das partículas de sílica, foram adicionados 50µL de água destilada estéril ao tubo, que foi agitado para a ressuspensão das partículas, incubado a 56°C por 10 min, homogeneizado novamente em agitador e centrifugado a 12000g por 1 min. O sobrenadante (RNA) foi então transferido para um tubo estéril e estocado a -20°C até o momento do uso.

4.2.2 Eletroferese em Gel de Poliacrilamida

Os RNAs extraídos de todas as amostras foram submetidos à EGPA, para a triagem das amostras positivas e também para a análise dos perfis eletroforéticos. O método utilizado foi baseado nos protocolos descritos por Laemmli (1970), com modificações de Pereira et al. (1983). Este método baseia-se na utilização de um gel descontínuo, formado por uma fase superior (concentradora) a 4%, e uma fase inferior (separadora) a 7,5%, resultando em uma melhor separação e resolução dos segmentos genômicos do RNA viral da amostra. Como controles, foram utilizados RNAs das cepas padrões Wa e DS-1 da coleção do Laboratório de Microbiologia da UFTM, previamente extraídos.

4.2.2.1 Preparo dos géis e corrida

Os procedimentos de preparo dos géis e montagem da cuba de eletroforese foram realizados como recomendado pelos fabricantes das cubas utilizadas (*Mini-V8.10 Vertical Gel Electrophoresis System – GIBCO BRL – Life Technologies* e *Cuba vertical SE260 - Amersham*).

O pente foi inserido entre as placas de vidro e com o auxílio de uma caneta marcou-se à distância de um centímetro abaixo da linha dos dentes; a solução do gel 7,5% foi

preparada e vertida até o nível anteriormente marcado. Cobriu-se o gel com água destilada estéril, deixando polimerizar por aproximadamente 45 minutos a temperatura ambiente; posteriormente retirou-se a água, lavou-se a superfície do gel com água destilada, secou-se com auxílio de papel de filtro e verteu-se a solução de gel 4%. O pente foi inserido e deixando o gel polimerizar por aproximadamente 45 minutos em temperatura ambiente. Após a polimerização, o pente foi retirado, a superfície do gel foi lavada com água destilada e o gel foi colocado na cuba para a aplicação das amostras. Imediatamente antes de ser aplicado no gel, o RNA foi diluído em tampão de tratamento de amostras 4x (3:1) e incubado em banho-maria a 56°C por 10 minutos. Para a corrida, utilizou-se tampão Tris-Glicina 1X, preparado na hora a partir de uma solução concentrada (10x). As amostras foram aplicadas no gel e então submetidas à eletroforese, com voltagem constante de 90V por 3 horas e meia para cuba *Mini-V8.10 Vertical Gel Electrophoresis System – GIBCO BRL – Life Technologies* ou a 100V por 6 horas quando utilizada a cuba vertical SE260 - Amersham.

Após a corrida os géis eram retirados da cuba e seguiam-se os procedimentos para coloração, baseada no protocolo descrito por Herring et al. (1982). O gel retirado da cuba de eletroforese foi colocado em solução fixadora por 30 minutos, sob agitação constante e em seguida enxaguado em água destilada. Posteriormente o gel foi colocado em solução de nitrato de prata por 30 minutos, sob agitação constante. Após este período o gel foi enxaguado em água destilada e colocado em solução reveladora até que as 11 bandas de RNA viral pudessem ser visualizadas com nitidez. A solução reveladora foi então desprezada e o gel enxaguado com água destilada e colocado em solução neutralizante.

4.3 Caracterização dos RV do grupo A quanto aos seus eletroferotipos

Para alcançarmos o segundo objetivo, as amostras positivas foram novamente submetidas à EGPA para analisarmos os perfis de migração dos segmentos genômicos dos RV.

4.4 Caracterização dos genótipos G e P das amostras de RV do grupo A circulantes através da RT-PCR

Para alcançarmos o terceiro objetivo, as amostras positivas foram submetidas à genotipagem através da reação em cadeia da polimerase, precedida de transcrição reversa (RT-PCR), com base nos protocolos de Gouvea et al. (1990a), Gouvea, Santos & Timenetsky

(1994a e 1994b) e Gentsch et al. (1992), com a modificação na seqüência do iniciador 1T-1, descrita por Iturriza-Gómara et al. (2000).

Inicialmente foi feita a transcrição reversa (RT): nesta reação, os segmentos de RNA de fita dupla codificadores da proteína VP7 ou VP4 dos RV do grupo A foram usados como molde para que a enzima transcriptase reversa sintetizasse cópias de ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA). Após a RT, foi feita a amplificação (PCR), na qual utilizou-se iniciadores para regiões altamente conservadas entre os RV do grupo A. Para a genotipagem, o DNA obtido na primeira serviu como molde para a reação de tipagem, através do uso de uma solução com vários pares de oligonucleotídeos específicos para os vários genótipos de RV do grupo A; estes oligonucleotídeos geraram segmentos de tamanhos variados, de acordo com a especificidade de cada genótipo. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultra-violeta (UV). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com marcador de peso molecular (*Ladder 100pb – Ludwig Biotec*). Quando mais de um produto amplificado era observado, a reação era repetida utilizando-se somente o iniciador específico para o produto amplificado, buscando identificar se os produtos eram provenientes de mais de um tipo de RV do grupo A.

4.4.1 Reação de Transcrição

Para a amplificação do gene codificador da proteína VP7 foram utilizados os iniciadores Beg9 (5'-GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG-3') e End9 (5'-GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG-3'), complementares as regiões 1 a 28 e 1062 a 1038, respectivamente. Estes iniciadores geraram segmentos amplificados com um comprimento de 1062 pb.

Para a amplificação do gene codificador da proteína VP4 foram utilizados os iniciadores CON3 (5'-TGGCTTCGCCATTTTATAGACA-3') e CON2 (5'-ATTTCCGGACCATTTATAACC-3'), complementares aos nucleotídeos das posições 11 a 32 e 887 a 868, respectivamente. Estes iniciadores geram segmentos amplificados com um comprimento de 887pb.

Para a reação de RT foi feita uma mistura contendo: 6µL do RNA extraído de cada amostra, 3µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 1µL da solução de oligonucleotídeos RT-G ou RT-P. Microtubos de 200µL contendo as reações foram aquecidos a 94°C por 3 min, para a abertura das fitas de RNA por desnaturação e rapidamente resfriados em banho de gelo. Posteriormente foi preparada a solução da reação como descrito na TABELA 10 (ANEXO II)

e 15 µl desta mistura da reação foram adicionados a cada tubo deixado em banho de gelo na etapa anterior. Os tubos foram então levados ao termociclador e submetidos ao programa: 25°C por 5 min, para que ocorresse o pareamento dos iniciadores, posteriormente a temperatura foi aumentada para 45°C por 50 min, para que a enzima fizesse a extensão e por fim a temperatura foi elevada à 70°C por 15 min, para que ocorresse a inativação da transcriptase reversa.

4.4.2 Reação de amplificação (PCR)

Essa reação amplifica o cDNA que foi obtido como produto da primeira reação. A mistura utilizada para esta reação está descrita na TABELA 11 (ANEXO II). A cada tubo com 22,5µL de solução de reação foram adicionados 2,5µL do cDNA correspondente obtido na primeira reação. Os tubos foram levados ao termociclador e submetidos ao programa: 94°C por 2 min, 30 ciclos de PCR (94°C por 30 s; 45°C por 1 min; 70°C por 1 min e 30 s), ao final dos 30 ciclos a temperatura permaneceu em 70°C por 7 min e depois foi reduzida para 4°C.

4.4.3 Reação de genotipagem dos genótipos G

Ao longo do gene codificador da proteína VP7 dos RV do grupo A, existem seis regiões variáveis; dentro dessas regiões variáveis existem sequências conservadas que caracterizam os diferentes genótipos de RV humanos e animais. Nesta reação de genotipagem são utilizados oligonucleotídeos complementares a cada uma das sequências específicas de cada genótipo. Estes iniciadores podem produzir segmentos de tamanhos variados dependendo do tipo do vírus analisado, caracterizando desta forma os diferentes genótipos G de RV humanos e animais.

Para identificar os RV humanos do grupo A, foi utilizada uma solução de oligonucleotídeos denominada Gh, composta pelos oligonucleotídeos aAT8, específico para o genótipo G8; aBT1 específico para o genótipo G1; o aCT2 específico para o genótipo G2; aDT4 específico para o genótipo G4; o aET3 específico para o genótipo G3 e o aET9 específico para o genótipo G9. O conjunto de iniciadores para tipagem dos genótipos G geram segmentos amplificados de 885, 749, 652, 583, 374 e 306 pb, respectivamente (Figura 10). A esta mistura também foi adicionado o oligonucleotídeo RVG9, que é utilizado como anti-senso a todos os oligonucleotídeos de tipagem.

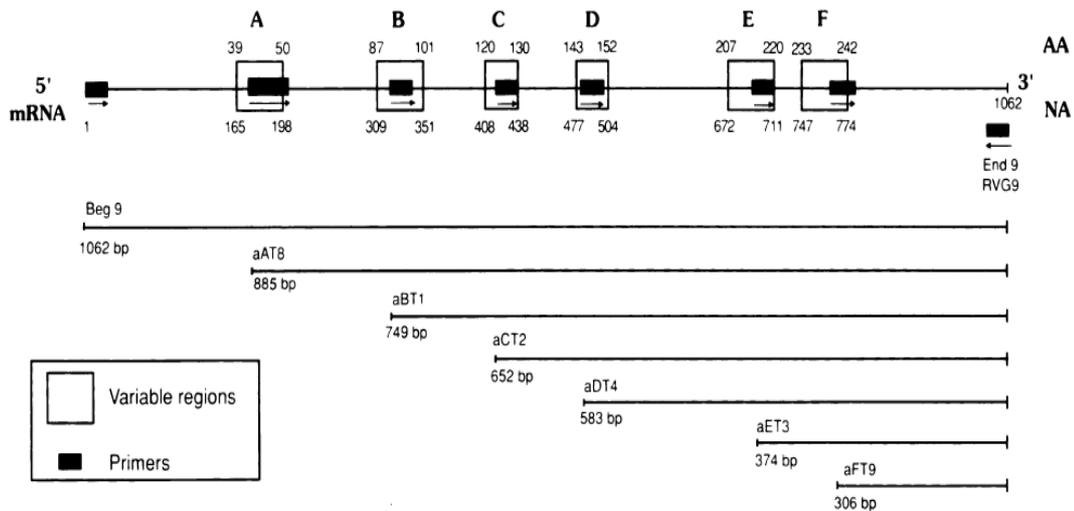


Figura 10: Esquema de caracterização do gene que codifica a proteína VP7 dos RV humanos (grupo A) por RT-PCR. A figura mostra as seis regiões variáveis (A a F), os iniciadores utilizados na reação de tipagem e o tamanho dos segmentos amplificados.

Fonte: (GOUVEA et al., 1990a).

Para identificar os RV do grupo A de origem animal que pudessem ter infectado humanos, utilizou-se uma solução de oligonucleotídeos denominada Ga, composta pelos oligonucleotídeos FT5, específico para genótipo G5; ET10 específico para genótipo G10; DT6 específico para genótipo G6; BT11 específico para genótipo G11 e HT8 específico para genótipo G8. Estes oligonucleotídeos geram amplificados de 780, 715, 500, 337 e 274pb, respectivamente (Figura 11). A esta mistura também foi adicionado o oligonucleotídeo sBeg9, que é utilizado como anti-senso a todos os oligonucleotídeos de tipagem.

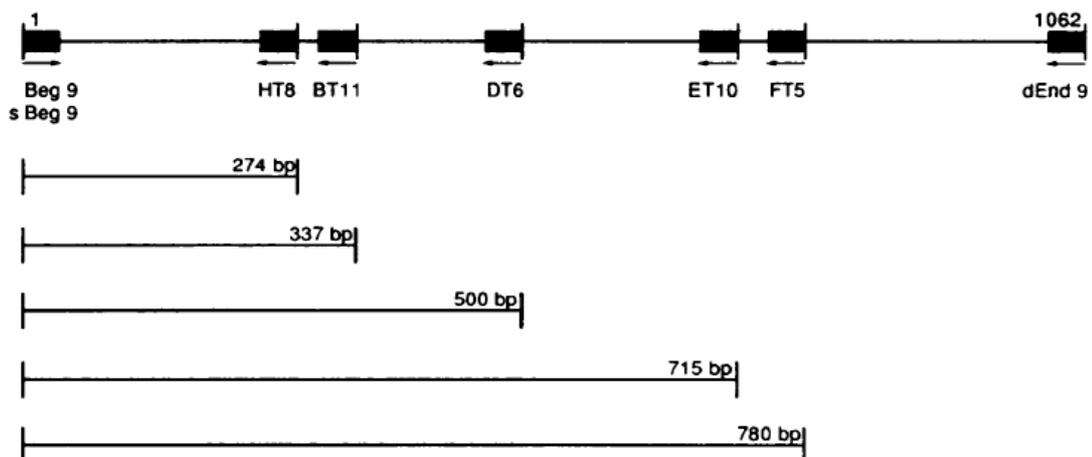


Figura 11: Esquema de caracterização do gene que codifica a proteína VP7 dos RV animais (grupo A) por RT-PCR. A figura mostra os iniciadores utilizados na reação de tipagem e o tamanho dos segmentos amplificados.

Fonte: (GOUVEA; SANTOS; TIMENETSKY, 1994a).

4.4.4 Reação de genotipagem (*Nested-PCR*) dos genótipos P

Para a caracterização dos genótipos P foi utilizada metodologia semelhante à da caracterização dos genótipos G. Para tipar RV humanos do grupo A, foi utilizada a mistura de oligonucleotídeos denominada Ph, composta pelos oligonucleotídeos: 1T1-D específico para genótipo P[8]; 2T-1 específico para genótipo P[4]; 3T-1, específico para genótipo P[6]; 4T-1 específico para genótipo P[9]; 5T-1 específico para genótipo P[10] e 6T-1 específico para genótipo P[3]. O conjunto de “oligonucleotídeos” para a tipagem dos genótipos P gera segmentos amplificados de 267, 345, 391, 483 e 583 e 748 pb, respectivamente (Figura 12). Nesta mistura também foi adicionado o oligonucleotídeo con3 como anti-senso a todos os iniciadores de tipagem.

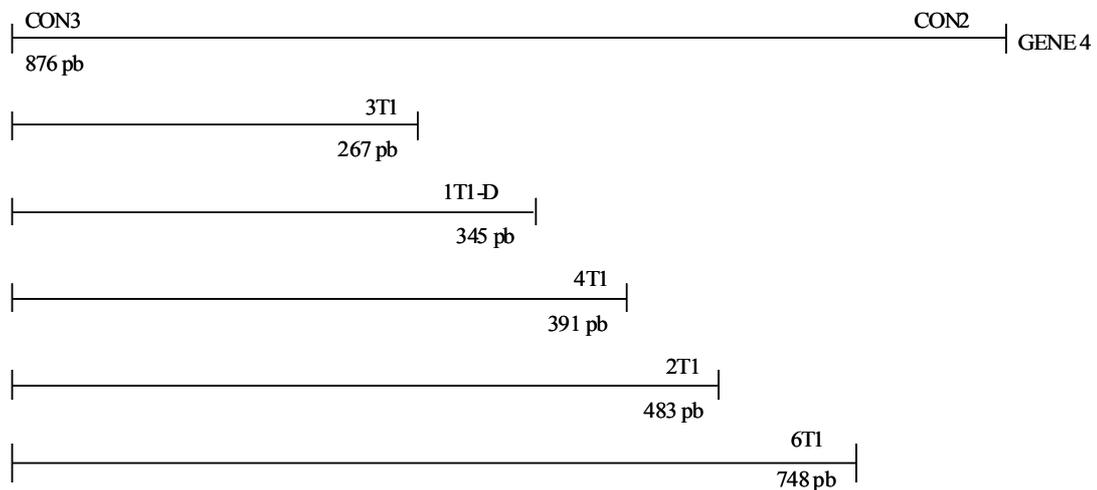


Figura 12: Esquema de caracterização do gene que codifica a proteína VP4 dos RV humanos (grupo A) por RT-PCR. A figura mostra os iniciadores e o tamanho dos segmentos gerados. Fonte: (Modificado de GENTSCH et al., 1992).

Para identificar os RV do grupo A de origem animal que pudessem ter infectado humanos, foi utilizada a mistura de oligonucleotídeos Pa, composta pelo oligonucleotídeos pNCDV, específico para P[1]; pUK, específico para P[5]; pOSU, específico para P[7]; pGott, específico para P[6] e pB223, específico para P[11]. Estes oligonucleotídeos geram segmentos de 662, 555, 502, 423 e 314 pb, respectivamente (Figura 13). Na mistura também foi adicionado o oligonucleotídeo con2 como anti-senso a todos os iniciadores de tipagem.

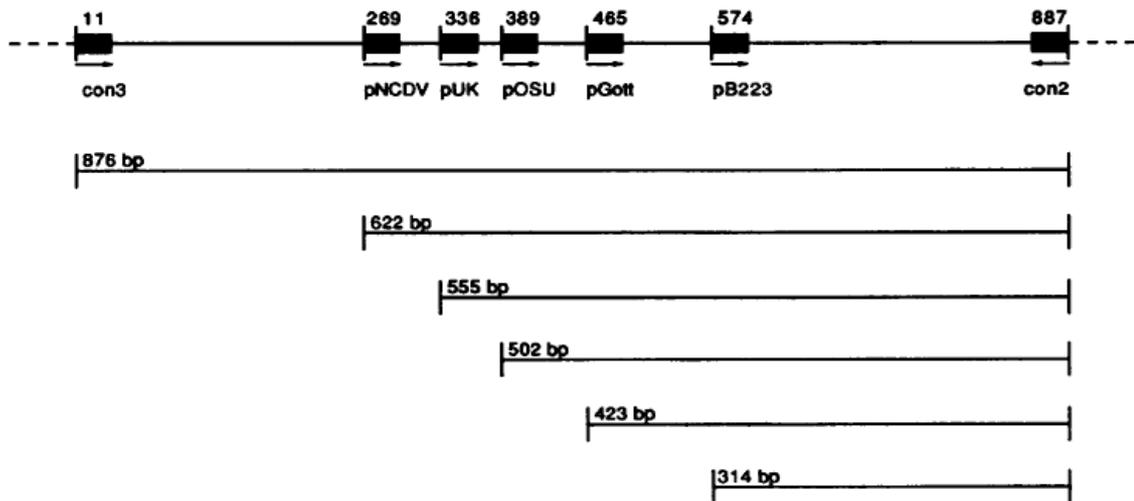


Figura 13: Esquema de caracterização do gene que codifica a proteína VP4 dos RV animais (grupo A) por RT-PCR. A figura mostra os iniciadores e o tamanho dos segmentos gerados. Fonte: (GOUVEA; SANTOS; TIMENETSKY, 1994b).

Em cada reação de tipagem foram utilizados 23 μ L da mistura de reação descrita na TABELA 12 (ANEXO II), aos quais foram adicionados 2 μ L do cDNA correspondente, previamente amplificado. Os tubos foram levados ao termociclador e submetidos ao programa: 95°C por 2 min; 30 ciclos de PCR (95°C por 30 s; 50°C por 50 s; 72°C por 1 min); 72°C por 7 min; e depois foi reduzida para 4°C.

No final da reação, os produtos foram visualizados sob luz U.V., após ser realizada eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 5% de brometo de etídio a concentração de 10mg/mL, em tampão Tris-Boro-EDTA (TBE). O DNA foi diluído em tampão de amostra 4x (3:1), foi aplicado no gel e a corrida foi feita a 100 V por 1 hora. O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação ao marcador de peso molecular (*Ladder 100pb – Ludwig Biotec*).

4.5 Análise dos aspectos epidemiológicos observados nas amostras estudadas

Para alcançarmos o quarto objetivo, os dados dos pacientes, fornecidos juntamente com as amostras fecais foram analisados em associação à caracterização molecular dos RV do grupo A. Os dados colhidos nas fichas de identificação foram digitalizados, organizados em um banco de dados e posteriormente analisados. Foi feita uma análise epidemiológica descritiva dos dados em função da idade das crianças, procedência e ao período de coleta das amostras.

4.6 Análise estatística

Os dados foram analisados usando o software estatístico R (*R Foundation for Statistical Computing*). Os métodos estatísticos utilizados foram o teste de hipótese para a diferença entre duas proporções, e o teste de qui-quadrado para a comparação entre duas ou várias proporções. O primeiro teste, com base na estatística Z_c , permite rejeitar a hipótese de igualdade entre as duas proporções se o valor da estatística for maior que 1,96 ou menor que $-1,96$. O teste de qui-quadrado permite rejeitar a hipótese de igualdade entre as proporções se o p-valor for inferior 0,05.

5.0 RESULTADOS

5.1 Amostragem e frequência da infecção por RV do grupo A na amostra estudada

De abril de 2007 a julho de 2010, foram analisadas quinhentas e noventa e duas amostras fecais de crianças com diarreia, colhidas em Uberaba (2007 a 2009) e em Uberlândia (2008 a 2010), MG; destas, 214 (36,1%) foram coletadas em Uberaba e 378 (63,9%) em Uberlândia. Estas amostras distribuíram-se ao longo do período coletado segundo as FIGURAS 14 e 15. Todas as amostras fecais foram submetidas à extração do RNA viral e analisadas através de EGPA.

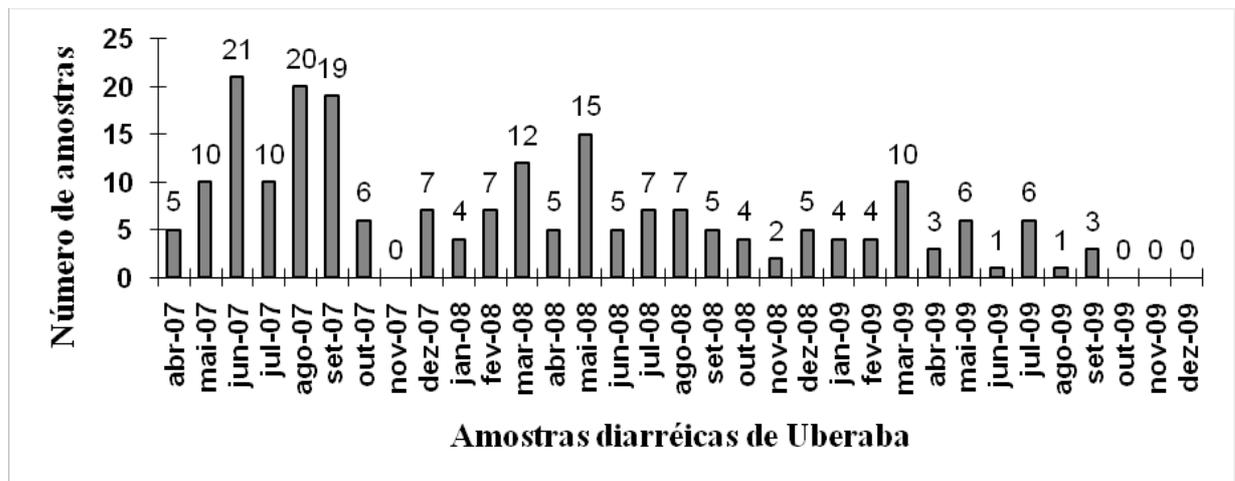


Figura 14: Distribuição das amostras diarréicas ao longo dos meses estudados em Uberaba.

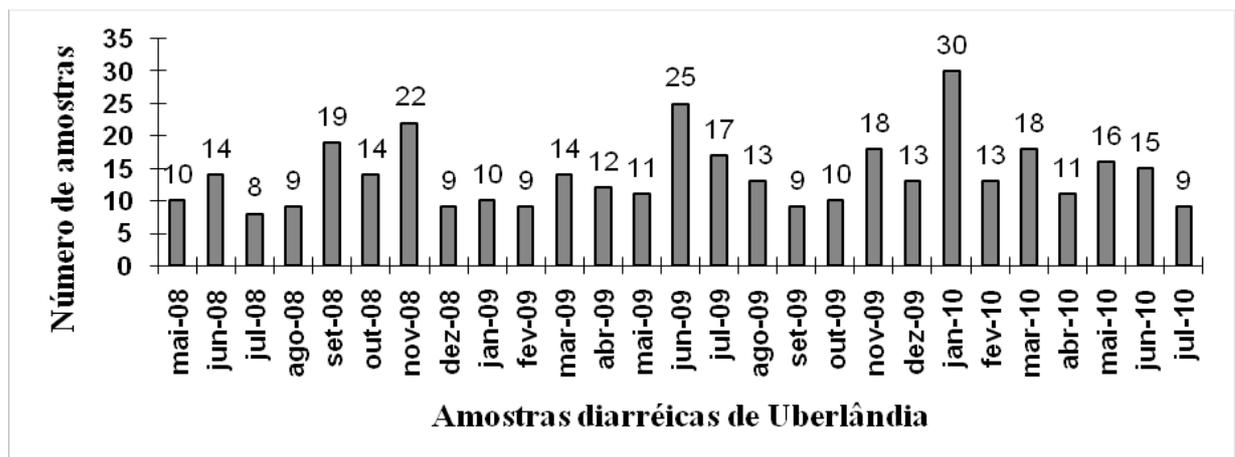


Figura 15: Distribuição das amostras diarréicas ao longo dos meses estudados em Uberlândia.

O percentual geral de positividade para RV foi de 12,5% (74/592). Analisando a positividade em relação às localidades, em Uberaba a prevalência geral foi de 18,2% (39/214) e em Uberlândia 9,3% (35/378). As prevalências anuais em Uberaba ao longo do período estudado foram 33,7% em 2007 (33/98), 6,4% em 2008 (5/78) e 2,6% em 2009 (1/38). Observou-se diferença estatisticamente significativa entre a proporção de amostras positivas

para RV comparando 2007 com 2008 ($Z_c=4,94$) e 2007 com 2009 ($Z_c=5,72$). No entanto, entre os anos de 2008 e 2009 não houve diferença estatística ($Z_c=1,003$). Em Uberlândia as prevalências anuais foram: 19% em 2008 (20/105), 0,6% em 2009 (1/161) e 12,5% em 2010 (14/112). Foi observada diferença significativa entre os anos de 2008 e 2009 ($Z_c=4,75$) e entre 2009 e 2010 ($Z_c=3,75$). No entanto, entre os anos de 2008 e 2010 não houve diferença significativa ($Z_c=1,31$). A distribuição das amostras analisadas é apresentada na TABELA 1.

Tabela 1: Número de amostras analisadas, número e proporção de amostras positivas para RV do grupo A ao longo do período estudado, por cidade.

Amostras de pacientes	2007		2008		2009		2010	
	No. Analisadas	No. Positivas (%)						
Uberaba	98	33 (33,7)	78	5 (6,4)	38	1 (2,6)	0	0
Uberlândia	0	0	105	20 (19,0)	161	1 (0,6)	112	14 (12,5)
Total	98	33 (33,7)	183	25 (13,7)	199	2 (1,0)	112	14 (12,5)

Dentre as amostras recebidas, 19,6% (116/592) eram provenientes de pacientes internados, sendo que 62 amostras foram coletadas em 2007, 20 em 2008, 23 em 2009 e 11 em 2010; e 80,4% (466/592) de pacientes atendidos em ambulatórios, sendo 36 amostras coletados em 2007, 163 em 2008, 176 em 2009 e 101 em 2010.

Entre as amostras positivas para RV, 56,8% (42/74) eram provenientes de pacientes internados, sendo 24 amostras detectadas em 2007, nove em 2008, nenhuma em 2009 e nove em 2010; e 43,2% (32/74) provenientes de pacientes atendidos em ambulatórios, destas, nove foram coletadas em 2007, dezesseis em 2008, duas em 2009 e cinco em 2010. A prevalência do RV em pacientes internados foi de 36,2% e em pacientes ambulatoriais 6,7%. Observou-se diferença significativa entre estes pacientes ($p<0,0001$).

Analisando separadamente as localidades, observa-se que tanto em Uberaba quanto em Uberlândia, as crianças internadas foram também significativamente mais acometidas ($p<0,0001$) pela infecção por RV que as crianças atendidas nos ambulatórios (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2: Número de amostras analisadas, número e proporção de amostras positivas para RV do grupo A, por procedência (interno ou ambulatorial), ao longo dos anos, em Uberaba.

Amostras de pacientes	Uberaba 2007		Uberaba 2008		Uberaba 2009		Total	
	No. Analisadas	No. Positivas (%)						
Internados	62	24 (38,7)	6	1 (16,7)	6	0 (0,0)	74	25 (33,8)
Ambulatoriais	36	9 (25,0)	72	4 (5,6)	32	1 (3,1)	140	14 (10,0)
Total	98	33 (33,7)	78	5 (6,4)	38	1 (2,6)	214	39 (18,2)

Tabela 3: Número de amostras analisadas, número e proporção de amostras positivas para RV do grupo A, por procedência (interno ou ambulatorial), ao longo dos anos, em Uberlândia.

Amostras de pacientes	Uberlândia 2008		Uberlândia 2009		Uberlândia 2010		Total	
	No. Analisadas	No. Positivas (%)	No. Analisadas	No. Positivas (%)	No. Analisadas	No. Positivas (%)	No. Analisadas	No. Positivas (%)
Internados	14	8 (57,1)	17	0 (0,0)	11	9 (81,9)	42	17 (40,5)
Ambulatoriais	91	12 (13,2)	144	1 (0,7)	101	5 (5,0)	336	18 (5,4)
Total	105	20 (19,0)	161	1 (0,6)	112	14 (12,5)	378	35 (9,3)

Observou-se diferença estatisticamente significativa entre a proporção de amostras positivas para RV comparando-se as diferentes faixas etárias ($p=0,00009$). A faixa etária mais acometida pela infecção foi a de 37 a 48 meses (Tabela 4) e crianças abaixo de um ano de idade foram menos acometidas pela infecção que as crianças acima de um ano. Em Uberaba, a faixa etária mais acometida pela infecção também foi à faixa entre 37 e 48 meses, no entanto observou-se que no ano de 2007 crianças com idade entre 13 e 24 meses foram as mais acometidas (Tabela 5). Já em Uberlândia, a faixa etária mais acometida foi a de 25 a 36 meses (Tabela 6).

Tabela 4: Total de amostras analisadas e amostras positivas para RV do grupo A, de acordo com as faixas etárias, em Uberaba e Uberlândia.

Faixa etária (meses)	No. Analisadas	No. Positivas (%)
0 - 6	75	3 (4,0)
7 - 12	258	19 (7,4)
13 - 24	99	18 (18,2)
25 - 36	61	12 (19,7)
37 - 48	45	11 (24,4)
>48	51	11 (21,6)
ND	3	0
Total	592	74 (12,5)

ND – idade não determinada.

Tabela 5: Amostras analisadas e amostras positivas para RV do grupo A, de acordo com as faixas etárias, por ano, em Uberaba.

Faixa etária (meses)	Uberaba 2007		Uberaba 2008		Uberaba 2009		Total	
	No. Analisadas	No. Positivas (%)						
0 - 6	13	2 (15,4)	14	0	8	0	35	2 (5,7)
7 - 12	36	9 (25,0)	28	2 (7,1)	14	0	78	11 (14,1)
13 - 24	12	7 (58,3)	12	0	1	0	25	7 (28,0)
25 - 36	11	3 (27,3)	9	0	3	0	23	3 (13,0)
37 - 48	8	3 (37,5)	11	3 (27,3)	1	1 (100)	20	7 (35,0)
>48	16	9 (56,3)	4	0	10	0	30	9 (30,0)
ND	2	0	0	0	1	0	3	0
Total	98	33 (33,7)	78	5 (6,4)	38	1 (1,0)	214	39 (18,2)

ND – idade não determinada.

Tabela 6: Amostras analisadas e amostras positivas para RV do grupo A, de acordo com as faixas etárias, por ano, em Uberlândia.

Faixa etária (meses)	Uberlândia 2008		Uberlândia 2009		Uberlândia 2010		Total	
	No. Analisadas	No. Positivas (%)	No. Analisadas	No. Positivas (%)	No. Analisadas	No. Positivas (%)	No. Analisadas	No. Positivas (%)
0 - 6	9	0	14	0	17	1 (5,9)	40	1 (2,5)
7 - 12	37	2 (5,4)	84	0	59	6 (10,2)	180	8 (4,4)
13 - 24	23	6 (26,1)	29	0	22	5 (22,7)	74	11 (14,9)
25 - 36	19	7 (36,8)	14	0	5	2 (40,0)	38	9 (23,7)
37 - 48	10	3 (30,0)	10	1 (10)	5	0	25	4 (16,0)
>48	7	2 (28,6)	10	0	4	0	21	2 (9,5)
Total	105	20 (19)	161	1 (0,6)	112	14 (12,5)	378	35 (9,3)

Quando analisou-se a distribuição das amostras por faixa etária e procedência (pacientes internados ou ambulatoriais), observou-se uma prevalência maior do vírus em pacientes internados na faixa etária entre 13 a 24 meses. Além disso, a prevalência do vírus em pacientes internados foi maior que em pacientes atendidos nos ambulatórios, independente da faixa etária (Tabela 7). Observaram-se dados semelhantes quando as cidades foram analisadas separadamente (dados não mostrados).

Tabela 7: Distribuição das amostras analisadas e positivas para RV do grupo A, por faixa etária e procedência (internados ou ambulatoriais) da amostra, no Triângulo Mineiro.

Faixa etária (meses)	Amostras de Pacientes	Nº Analisadas	Nº Positivas (%)
0 - 6	Ambulatoriais	63	1 (1,6)
	Internados	12	2 (16,7)
7 - 12	Ambulatoriais	212	5 (2,4)
	Internados	46	14 (30,4)
13 - 24	Ambulatoriais	76	5 (6,6)
	Internados	23	13 (56,5)
25 - 36	Ambulatoriais	49	8 (16,3)
	Internados	12	4 (33,3)
37 - 48	Ambulatoriais	34	7 (20,6)
	Internados	11	4 (36,4)
> 48	Ambulatoriais	42	8 (19,0)
	Internados	9	3 (33,3)
ND	Ambulatoriais	0	0
	Internados	3	0

5.2 Sazonalidade dos casos de diarreia e de rotavirose

Analisando a distribuição das amostras recebidas e dos casos de rotavirose ao longo dos quatro anos estudados, observou-se que eles coincidiram com os meses de seca (maio a outubro) e/ou inverno (julho a setembro), com exceção de um caso detectado em novembro de 2008 em Uberlândia (Figura 16). Observou-se também que alguns picos de casos de diarreia não coincidiram com os picos de casos de rotavirose, principalmente no ano de 2009.

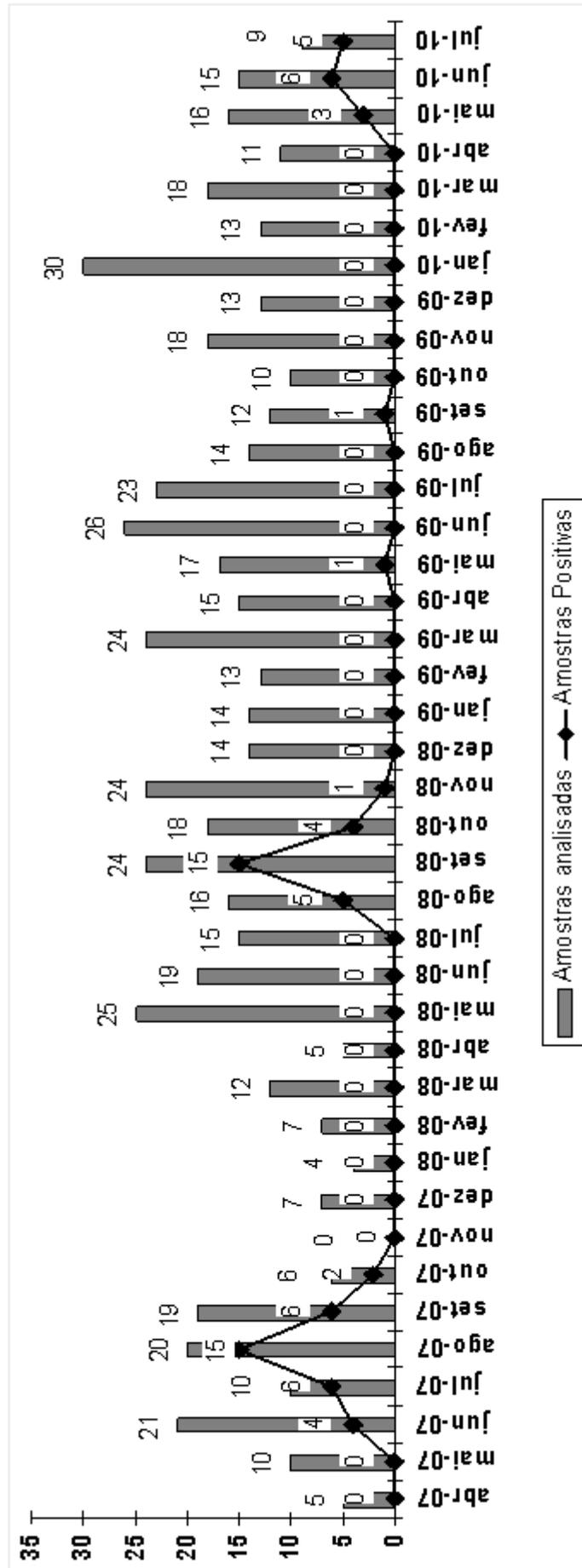


Figura 16: Distribuição mensal de todas as amostras analisadas e positivas para RV na região do Triângulo Mineiro.

5.3 Caracterização dos RV do grupo A quanto aos seus eletroferotipos e associação aos aspectos epidemiológicos

Baseado no padrão de corrida dos segmentos genômicos dos RV através de eletroforese em gel de poliacrilamida, observou-se que todas as amostras exibiram o padrão de corrida 4-2-3-2, característico dos RV do grupo A;

De acordo com a mobilidade dos dois últimos segmentos genômicos dos RV (10 e 11), 95,9% (71/74) das amostras apresentaram eletroferotipos curtos e 4,1% (3/74), eletroferotipos longos (Figura 17). Em Uberaba os RV de eletroferotipo curto foram detectados em 2007 nos meses junho (4 casos), julho (6 casos), agosto (15 casos), setembro (6 casos) e outubro (2 casos); em 2008, nos meses agosto (2 casos) e setembro (3 casos); em 2009, RV só foi detectado em uma amostra, esta apresentou eletroferotipo longo e foi coletada no mês de maio de uma criança com 4 anos. Em Uberlândia os RV de eletroferotipos curtos foram detectados em 2008 nos meses agosto (3 casos), setembro (11 casos), outubro (4 casos) e novembro (1 caso); em 2010 foram detectados em maio (3 casos), junho (6 casos) e julho (5 casos). Foram também detectados dois RV de eletroferotipos longos, um em setembro de 2008 de uma criança de três anos e outro em setembro de 2009 de uma criança de quatro anos (Figura 18).

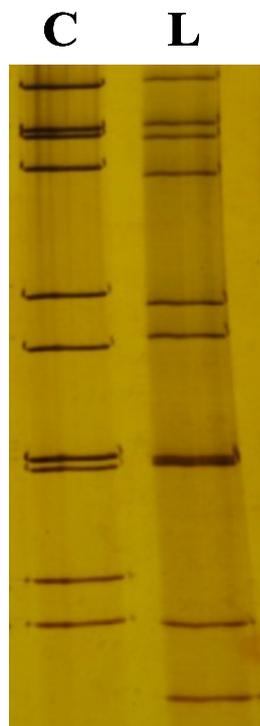


Figura 17: EGPA de RV do grupo A extraídos a partir de duas amostras fecais, uma de eletroferotipo curto (C) e outro de eletroferotipo longo (L).

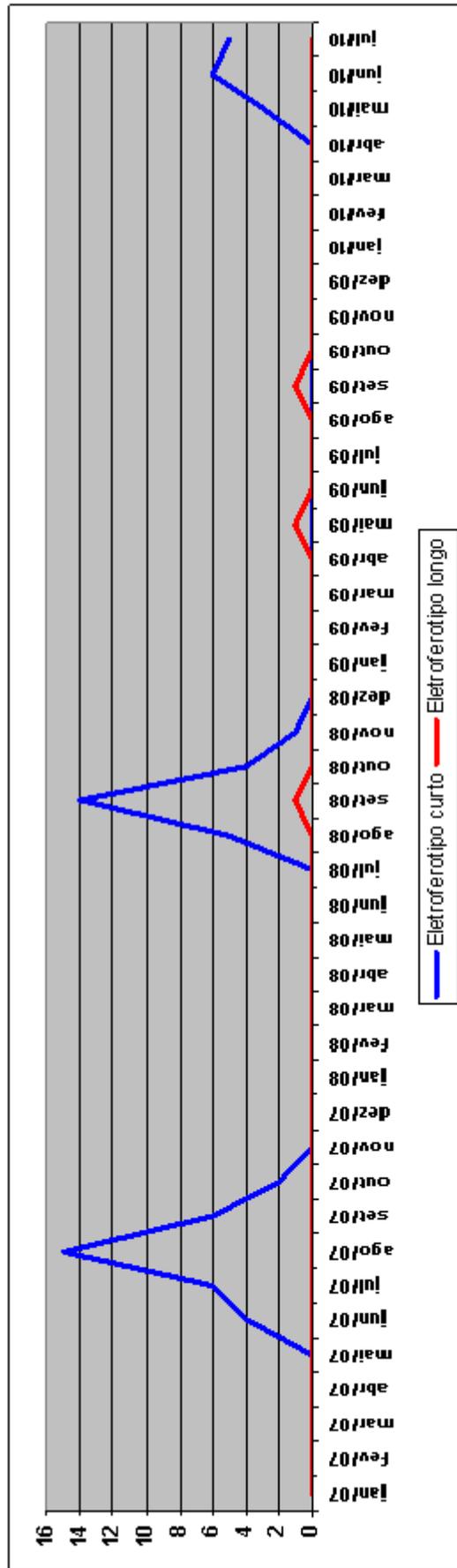


Figura 18: Distribuição dos eletroferotipos longos e curtos ao longo do período estudado.

Quando os eletroferotipos também foram analisados de acordo com o padrão de mobilidade dos outros segmentos (1 ao 11), observou-se a circulação de variantes de RV de eletroferotipos curtos (Figura 19) e longos (Figura 20) em Uberaba e Uberlândia ao longo do período estudado.

Observou-se uma característica interessante em relação aos eletroferotipos curtos: os padrões de mobilidade dos segmentos genômicos sofrem alterações quando submetidos a novas corridas eletroforéticas. Quando as amostras variantes detectadas inicialmente, eram colocadas em um próximo gel para comparação com eletroferotipos de outras amostras, elas não mantinham o mesmo perfil de migração (principalmente dos segmentos 7, 8 e 9), comportando-se diferentemente e gerando um eletroferotipo diferente a cada corrida (Figura 21); este fato dificultou o acompanhamento das variantes de RV e a classificação dos eletroferotipos circulantes ao longo do período de estudo.

Esta inconstância no padrão de migração dos segmentos genômicos foi observada apenas nas amostras de eletroferotipos curtos; as amostras de eletroferotipos longos mantiveram os seus padrões de migração caracterizados inicialmente, mesmo quando colocadas em géis diferentes (Figura 22).

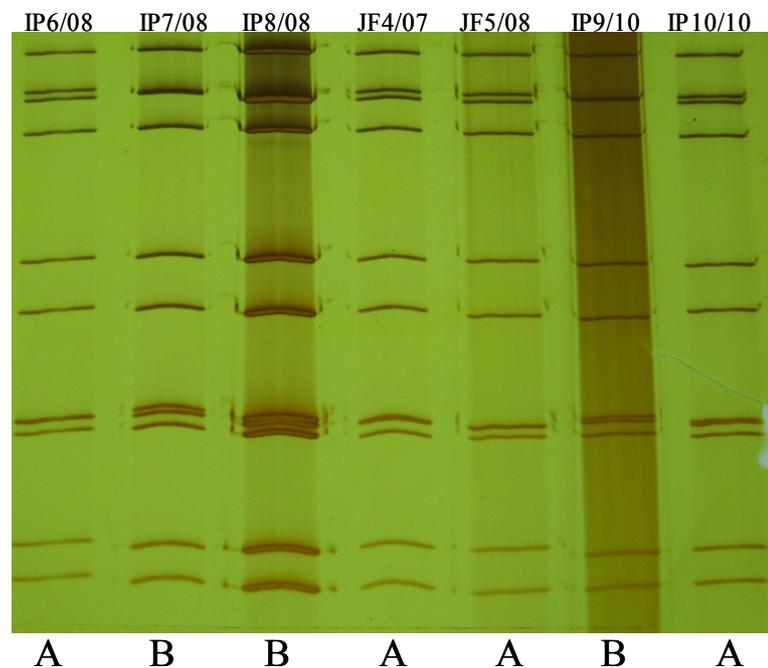


Figura 19: EGPA de RV do grupo A extraídos a partir de amostras fecais. O gel mostra sete amostras de eletroferotipos curtos detectadas nos anos de 2007, 2008 ou 2010 (número após a barra). Observaram-se duas variantes de RV, classificadas como A e B (parte inferior do gel). IP- amostra proveniente do Laboratório IPAC de Uberlândia; JF – amostra proveniente do Laboratório Jorge Furtado de Uberaba.



Figura 20: EGPA de RV do grupo A extraídos a partir de amostras fecais. O gel mostra três amostras de eletroferotipos longos detectadas em 2008 e 2009. Observaram-se três variantes de RV, classificadas como A, B e C (parte inferior do gel). IP- amostra proveniente do Laboratório IPAC de Uberlândia; JF – amostra proveniente do Laboratório Jorge Furtado de Uberaba.

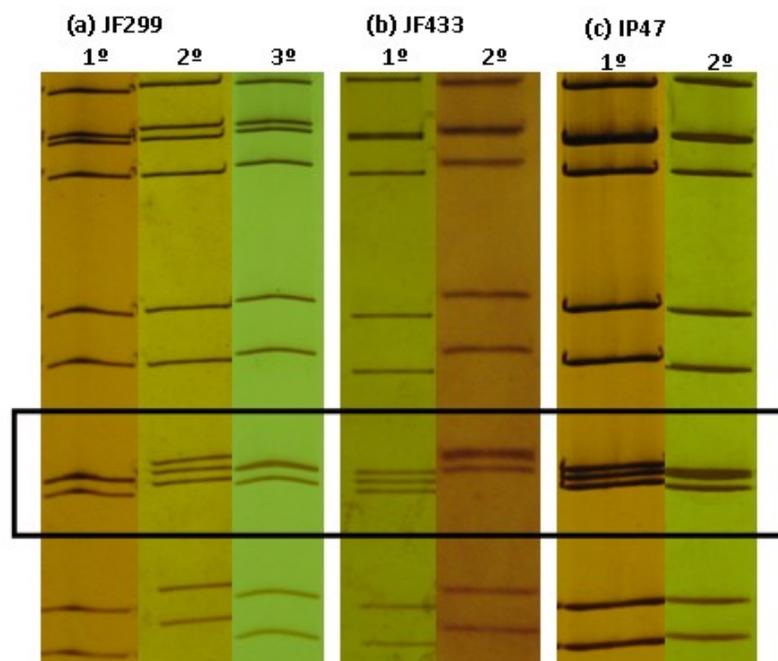


Figura 21: EGPA de RV do grupo A extraídos a partir de amostras fecais. A figura mostra três exemplos de amostras com eletroferotipo curto [(a),(b),(c)], que quando repetidas em géis diferentes (1º, 2º, 3º), apresentam diferenças nos padrões de mobilidade dos segmentos genômicos, principalmente entre os segmentos 7, 8 e 9. IP – amostras do Laboratório IPAC de Uberlândia. JF – amostras do Laboratório Jorge Furtado, de Uberaba.

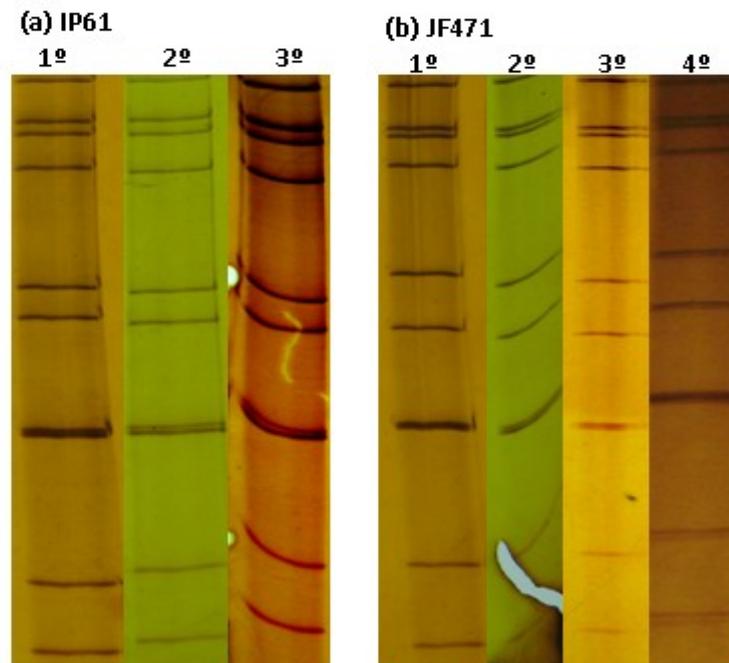


Figura 22: EGPA de RV do grupo A extraídos a partir de amostras fecais. A figura mostra dois exemplos de amostras com eletroferotipo longo [(a) e (b)], que mantêm os mesmos padrões de mobilidade dos segmentos genômicos quando repetidas em géis diferentes (1º, 2º, 3º...). IP- amostra proveniente do Laboratório IPAC de Uberlândia; JF – amostra proveniente do Laboratório Jorge Furtado de Uberaba.

5.4 Identificação dos genótipos G e P dos RV do grupo A circulantes e associação com os dados epidemiológicos

5.4.1 Genótipos G humanos e animais

De acordo com a tipagem do gene que codifica a glicoproteína VP7 por RT-PCR, das setenta e quatro amostras analisadas, 71 (95,9%) foram classificadas como genótipo G2, gerando um produto de amplificação de 652pb; duas (2,7%) foram classificadas como genótipo G3, gerando um produto amplificação de 374pb e uma amostra (1,4%) foi classificada como infecção mista, de genótipos G5 e G10 gerando produtos amplificados de 780 e 715pb, respectivamente (Figura 23). A Figura 24 mostra uma foto com os fragmentos amplificados.

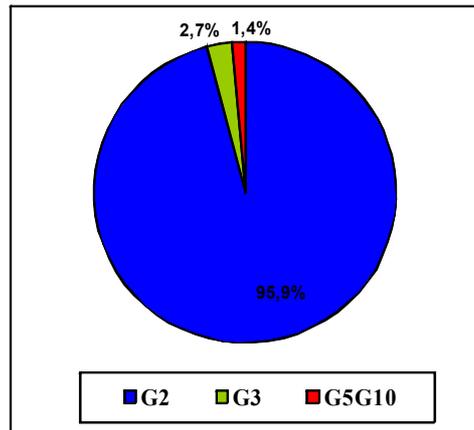


Figura 23: Porcentagem de detecção dos genótipos G em todo o período estudado.

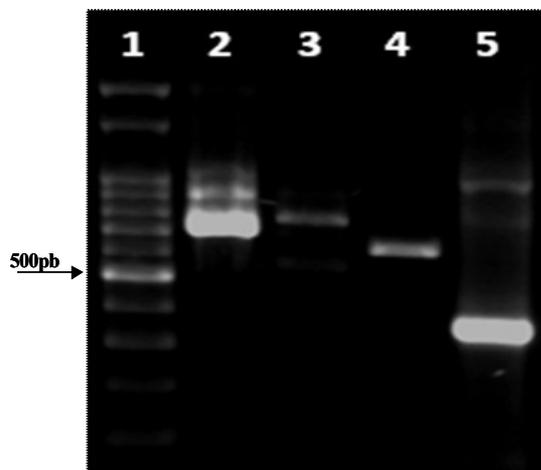


Figura 24: Gel de agarose 1%, mostrando os produtos amplificados após genotipagem do gene 9 de amostras de RV do grupo A, por RT-PCR. 1 – marcador de peso molecular de 100pb (Ludwing Biotec®). Linhas 2, 3, 4 e 5, mostram nesta ordem amplicons de 715, 780, 652 e 374pb, característicos dos genótipos G10, G5, G2 e G3, respectivamente.

5.4.2 Genótipos P humanos e animais

Baseado na tipagem do gene que codifica a proteína VP4 por RT-PCR, das setenta e quatro amostras analisadas, 71 (95,9%) foram classificadas como genótipo P[4], gerando produtos de 483pb; uma amostra (1,4%) foi classificada como infecção mista pelos genótipos P[8] e P[4], gerando fragmentos amplificados de 345 e 483pb, respectivamente. Duas amostras (2,7%) não foram tipadas através da RT-PCR (Figura 25). A Figura 26 mostra uma foto com os fragmentos amplificados. Nenhuma das amostras analisadas reagiu com os oligonucleotídeos específicos para os principais genótipos P dos RV animais do grupo A.

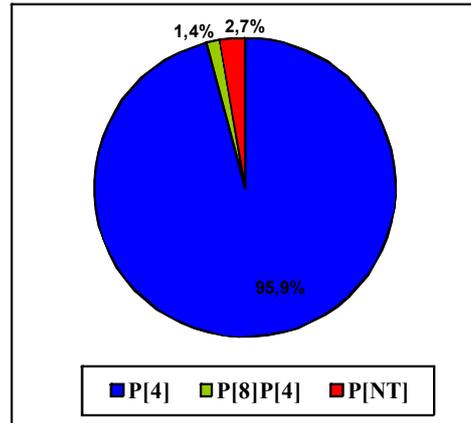


Figura 25: Porcentagem de detecção dos genótipos P em todo o período estudado. P[NT] – genótipo P não tipado.

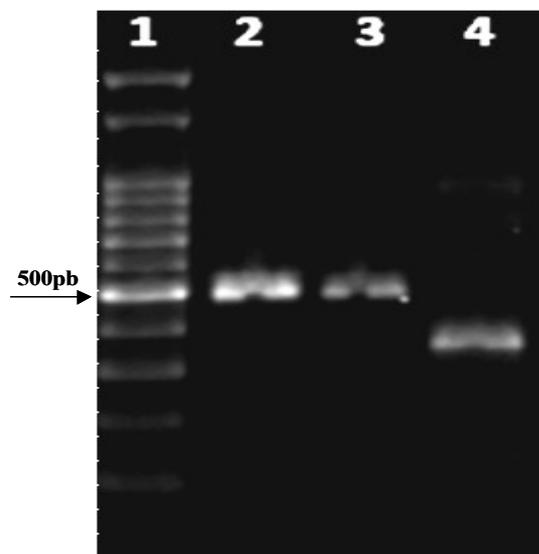


Figura 26: Gel de agarose 1%, mostrando os produtos amplificados após genotipagem do gene 4 de amostras de RV do grupo A, por RT-PCR. 1 – marcador de peso molecular de 100pb (Ludwing Biotec®). Linhas 2, 3 e 4 mostram nesta ordem amplicons de 483, 483 e 345pb, característicos dos genótipos P[4] e P[8], respectivamente.

5.4.3 Classificação das amostras através das combinações entre os genótipos G e P

Classificando as amostras em relação às especificidades das duas proteínas antigênicas dos RV (VP4 e VP7), as setenta e uma amostras de eletroferotipo curto apresentaram a combinação G2P[4] e três amostras de eletroferotipo longo apresentaram as combinações G3P[8]+P[4], G3P[NT-não tipado], e G5+G10 P[NT] (Figura 27).

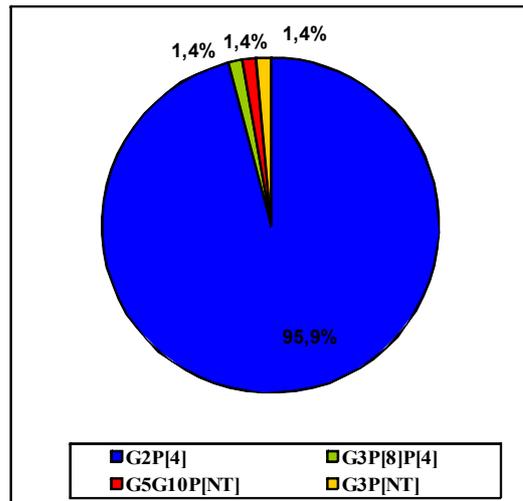


Figura 27: Porcentagem de detecção das combinações entre os genótipos G e P, em todo o período estudado. P[NT] – genótipo P não tipado.

O genótipo G2P[4] foi quase que exclusivamente o único detectado em 2007, 2008 e 2010; com exceção de uma amostra do genótipo G3P[8]P[4] detectada em setembro de 2008, em Uberlândia. No entanto, no ano de 2009, só foram detectadas duas amostras positivas para RV do grupo A, que foram genotipadas como: G5G10P[NT], coletada em maio de 2009 em Uberaba e G3P[NT] coletada em setembro de 2009 em Uberaba (Tabela 8).

Tabela 8: Número de amostras analisadas de cada cidade e seus respectivos genótipos.

Amostras de pacientes	2007		2008		2009		2010	
	Nº amostras	Genótipo	Nº amostras	Genótipo	Nº amostras	Genótipo	Nº amostras	Genótipo
Uberaba	33	G2P[4]	5	G2P[4]	1	G5G10P[NT]	0	0
Uberlândia	0	0	19	G2P[4]	1	G3P[NT]	14	G2P[4]
			1	G3P[8]P[4]				

5.5 Elegibilidade à vacinação para RV

Nas informações sobre a coleta e dados dos pacientes enviados junto com as amostras fecais não constavam dados vacinais, portanto não podemos afirmar quais crianças foram ou não vacinadas. No entanto, sabe-se que a vacina é aplicada em duas doses, uma aos 2 e outra aos 4 meses de idade, assim baseado na idade das crianças e na data de coleta da amostras, observou-se que das 74 crianças infectadas por RV, 35 (47,3%) eram elegíveis a vacinação (todas infectadas por RV de genótipo G2P[4]) e 39 (52,7%) não eram (Tabela 9).

Tabela 9: Amostras de RV do grupo A causadoras de diarreia em crianças elegíveis a vacinação.

Data de coleta da amostra (mês/ano)	Cidade	Idade da criança (meses)	Genótipo	Eletroferotipo
jun/07	Uberaba	12	G2P[4]	curto
jul/07	Uberaba	12	G2P[4]	curto
jul/07	Uberaba	12	G2P[4]	curto
jul/07	Uberaba	12	G2P[4]	curto
ago/07	Uberaba	3	G2P[4]	curto
ago/07	Uberaba	12	G2P[4]	curto
ago/07	Uberaba	11	G2P[4]	curto
ago/07	Uberaba	6	G2P[4]	curto
ago/07	Uberaba	12	G2P[4]	curto
ago/07	Uberaba	12	G2P[4]	curto
out/07	Uberaba	12	G2P[4]	curto
ago/08	Uberaba	12	G2P[4]	curto
set/08	Uberaba	12	G2P[4]	curto
ago/08	Uberlândia	8	G2P[4]	curto
set/08	Uberlândia	24	G2P[4]	curto
set/08	Uberlândia	24	G2P[4]	curto
set/08	Uberlândia	12	G2P[4]	curto
set/08	Uberlândia	24	G2P[4]	curto
set/08	Uberlândia	24	G2P[4]	curto
set/08	Uberlândia	24	G2P[4]	curto
set/08	Uberlândia	24	G2P[4]	curto
nov/08	Uberlândia	24	G2P[4]	curto
mai/10	Uberlândia	12	G2P[4]	curto
mai/10	Uberlândia	24	G2P[4]	curto
mai/10	Uberlândia	12	G2P[4]	curto
jun/10	Uberlândia	24	G2P[4]	curto
jun/10	Uberlândia	24	G2P[4]	curto
jun/10	Uberlândia	24	G2P[4]	curto
jun/10	Uberlândia	7	G2P[4]	curto
jun/10	Uberlândia	12	G2P[4]	curto
jun/10	Uberlândia	36	G2P[4]	curto
jul/10	Uberlândia	24	G2P[4]	curto
jul/10	Uberlândia	3	G2P[4]	curto
jul/10	Uberlândia	36	G2P[4]	curto
jul/10	Uberlândia	12	G2P[4]	curto
jul/10	Uberlândia	9	G2P[4]	curto

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram analisadas amostras de crianças das duas maiores cidades da região do Triângulo Mineiro. Esta região está localizada a oeste do Estado de Minas Gerais, possui uma área de 53.719 km² e população de cerca de 1.500.000 habitantes. Existe um tráfego constante de pessoas entre Uberaba e Uberlândia, e destas para as capitais dos estados de Minas Gerais, São Paulo e Goiás. Poucos dados sobre a caracterização de agentes das gastroenterites estão disponíveis fora dos grandes centros do País, portanto este estudo vem contribuir ao conhecimento sobre a epidemiologia da infecção por RV.

Nosso grupo de pesquisa vem estudando as gastroenterites por RV desde setembro de 2005. Começamos analisando amostras de Uberaba e a partir de maio de 2008 passamos a analisar também amostras de Uberlândia. Dados preliminares de Uberaba (setembro de 2005 a dezembro de 2006) já foram publicados (DOMINGUES et al., 2008).

A partir de 2007, em Uberaba, o número de amostras coletadas decresceu ao longo do período estudado; em Uberlândia este decréscimo não foi observado (Tabela 1). Cabe destacar que a redução das amostras de Uberaba não foi devido à falhas de coleta e sim por uma diminuição acentuada na solicitação de diagnóstico para rotavirose; em 2010, por exemplo, foram realizadas apenas 9 solicitações de exames, que não foram consideradas neste estudo. As coletas foram realizadas continuamente em Uberaba (abril de 2007 a dezembro de 2009) e em Uberlândia (maio de 2008 a julho de 2010), representando quase todos os meses dos períodos, com exceção dos meses de novembro de 2007 e outubro, novembro e dezembro de 2009 em que não recebemos amostras (Figuras 14 e 15), o que nos leva a crer que os resultados sejam representativos e que nos permitem contribuir e esclarecer a epidemiologia dos RV na região do Triângulo Mineiro.

Observou-se a associação do RV do grupo A em 12,5% dos casos de diarreia aguda em crianças de zero a dez anos, atendidas em clínicas particulares, ambulatórios e hospitais públicos e privados. A prevalência encontrada em nosso estudo está dentro da faixa de detecção observada em outros estudos no Brasil, tais como, a de 15% em Uberaba, MG (DOMINGUES et al., 2008); 8,9% em Juiz de Fora, MG (ROSA e SILVA; CARVALHO; GOUVEA, 2002); 14,4% em Goiânia, GO (CARDOSO et al., 2003); 23,2% em Campo Grande, MS (ANDREASI et al., 2007); 29% no Rio de Janeiro, RJ (CARVALHO-COSTA et al., 2009); 20,5% em Vitória, ES (RIBEIRO et al., 2008); 28,3% nas cidades do Estado de São Paulo (MORILLO et al., 2010); 23,6% em Porto Velho, RO (MAGALHÃES et al.,

2007); 11% em Aracaju, SE (GURGEL et al., 2009); 35% em Recife, PE (MONTENEGRO et al., 2007) e 21,8% em cidades do Estado do Paraná (SANTOS et al., 2008).

A prevalência da infecção por RV do grupo A em Uberaba (18,2%) foi maior que a encontrada em Uberlândia (9,3%), porém o número de amostras e o período de coleta foram diferentes. Em Uberaba, observou-se um aumento da prevalência da infecção em 2007 (33,7%) em comparação com a prevalência de 15% encontrada em 2006 (DOMINGUES et al., 2008); em 2008, houve um declínio significativo (6,4%), que se manteve em 2009 (2,6%). Em Uberlândia, a prevalência da infecção em 2008 foi de 19%, diminuiu significativamente em 2009 (0,6%) e observou-se uma tendência de aumento (12,5%) até o mês de julho de 2010 (Tabela 1). Essa diminuição é atípica na epidemiologia dos RV, pois, apesar de ocorrerem comumente flutuações de prevalência, a observação de diminuições marcantes na prevalência de um ano para outro não é comum. Além disso, essa diminuição provavelmente não ocorreu pelo menor número de amostras recebidas de um ano para o outro em Uberaba, pois em Uberlândia, em 2009 o número de amostras recebidas foi até maior que em 2008 e esta queda também foi observada. Acreditamos que a vacinação contra RV implementada em 2006 possa ter influenciado esta mudança na prevalência.

Observou-se uma prevalência significativamente maior da infecção por RV do grupo A em pacientes internados do que nos atendidos em ambulatórios, o que já era esperado, pois a infecção pelo RV do grupo A é a principal causa de hospitalização de crianças por diarreia (ESTES; KAPIKIAN, 2007, GOUVEA et al., 2009, CARDOSO et al., 2003; KANE et al., 2004). Este fato pôde ser observado tanto em Uberaba, quanto em Uberlândia, em todos os anos, com exceção daqueles em que a positividade para RV foi muito baixa (Tabelas 2 e 3). A maior prevalência dos RV em pacientes internados foi observada em quase todas as faixas etárias (Tabela 7).

Apesar de termos verificado uma prevalência maior de infecção por RV nas fezes de crianças na faixa etária de 37 a 48 meses (Tabela 4), quando analisamos somente os casos mais graves de infecção pelo vírus (casos que levaram a internação) observamos que crianças mais jovens (13-24 meses) foram mais acometidas pela infecção (Tabela 7). A maioria dos estudos publicados mostram uma prevalência maior na faixa etária de 6 a 24 meses (TEIXEIRA et al., 1991; ZUCCOTTI et al., 2010; CARDOSO et al., 2003; ANDREASI et al., 2007; GOUVEA et al., 2009; LINHARES, 2000), inclusive o estudo prévio realizado em Uberaba (DOMINGUES et al., 2008); isto provavelmente porque crianças nesta faixa etária normalmente deixam de se alimentar exclusivamente do leite materno e assim passam a ter mais chance de entrar em contato com agentes infecciosos transmitidos por alimentos

contaminados. Esta transmissão ainda é facilitada pelos hábitos comportamentais dessas crianças de levar objetos até a boca. A alta prevalência de casos de rotavirose em crianças mais velhas observada nesse estudo, talvez seja um reflexo da ausência de vacinação em crianças mais velhas e/ou da circulação de um tipo diferente de vírus. Interessantemente, se analisarmos a proporção de casos de rotavirose em relação à faixa etária somente no ano de 2007, observamos que a faixa etária mais acometida foi a de 13 a 24 meses (Tabela 5), provavelmente porque essas crianças não eram vacinadas.

A região do Triângulo Mineiro possui o clima tropical de altitude, com temperaturas médias entre 17°C e 23°C. O comportamento pluviométrico é típico do clima tropical, caracterizando-se por um inverno seco e frio com baixa intensidade pluviométrica e verão quente e chuvoso. As chuvas de verão iniciam-se em outubro/novembro (estação úmida) e tornando-se mais raras a partir de março/abril, caracterizando a estação seca (BDI, 2008; PMU, 2009).

Em regiões de clima temperado as infecções por RV ocorrem predominantemente nos meses de seca e inverno; o Brasil, apesar de ser um país de clima tropical, nas regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste, a epidemiologia do RV apresenta-se como em países de clima temperado (LINHARES; ARAÚJO; JUSTINO, 2005). Tanto neste estudo, quanto no estudo prévio realizado na região (DOMINGUES et al., 2008), observou-se este padrão sazonal da infecção pelo RV do grupo A (Figura 16); a causa disto, não é completamente conhecida, mas acredita-se que o tempo seco favoreça a sobrevivência do vírus nas superfícies e que a aglomeração de pessoas no inverno facilite a transmissão do vírus (GOUVEA; SANTOS, 1997; BRANDT et al., 1982). Observou-se ainda que alguns picos de casos de diarreia não estavam associados à casos de rotavirose, sugerindo provavelmente uma participação de outro(s) agente(s) etiológico(s) importante(s) na etiologia das diarreias (Figura 16).

Todos os RV detectados neste estudo foram classificados como sendo do grupo A, que são os mais comumente encontrados em todo o mundo (ESTES; KAPIKIAN, 2007). Analisando a eletroferotipagem, observamos que em 2007, 2008 e 2010, com exceção de um caso em setembro de 2008 em Uberlândia, RV de eletroferotipos curtos foram quase que exclusivamente os únicos encontrados (Figura 18); estes RV de perfis curtos começaram a predominar na região em setembro de 2006 (DOMINGUES et al., 2008). O predomínio de RV de perfil curto neste mesmo período, também foi relatado em outras localidades (ESTEBAN et al., 2010; CHOUIKHA et al., 2009; NAKAGOMI et al., 2008; LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES, 2008).

Normalmente, através da análise dos eletroferotipos podemos também identificar tipos diferentes de RV quando percebemos variações na mobilidade de outros segmentos além do 10° e 11° (que classificam os eletroferotipos longos e curtos). Em nosso estudo, apesar de termos verificado a circulação de diferentes variantes de eletroferotipo curto (Figura 19), não foi possível determinar ou acompanhar a circulação de todas as variantes ao longo do período, já que os padrões de corrida não se mantinham de um gel para o outro (Figura 21). Isso provavelmente aconteceu por causa de interferências da estrutura secundária ou terciária dos segmentos de RNA dessas amostras (eletroferotipos curtos) na migração no gel de poliacrilamida. Fatores relacionados à técnica como concentração de acrilamida, condições de corrida e pureza do RNA, podem influenciar a mobilidade dos segmentos de alguns tipos virais. Em 2008, Ross et al., publicaram um trabalho mostrando mudança da posição relativa do gene 9 (VP7) de RV do genótipo G2, frente a mudanças na concentração de acrilamida no gel. Em 2010, Long-Croal et al., observaram que a concentração de acrilamida também afeta a posição relativa do gene 4 (VP4) de amostras de RV equínos com especificidade P[12]. No entanto, em nosso estudo, mantendo a concentração de acrilamida a 4%/7.5%, utilizada amplamente na maioria das publicações, e as mesmas condições de corrida e extração, detectamos variações (mudanças) na mobilidade dos segmentos 7, 8 ou 9 de uma mesma amostra em géis diferentes. Acreditamos que esta variação de mobilidade seja uma característica específica destas amostras de eletroferotipos curtos, já que as amostras de eletroferotipos longos quando corridas em diferentes géis mantiveram o mesmo padrão de corrida (Figura 22). Continuamos avaliando esta questão através de outras análises em nosso laboratório para tentar elucidá-la.

Analisando a caracterização dos genótipos das amostras de RV do grupo A, observamos o predomínio da combinação G2P[4], associado ao eletroferotipo curto. RV de perfil curto e genótipo G2P[4] começaram a circular em Uberaba a partir de agosto de 2006 (DOMINGUES et al., 2008) e foram praticamente o único tipo encontrado até 2008 (Tabela 8). O predomínio de amostras do genótipo G2P[4] também foi relatado neste mesmo período em várias outras localidades, na Europa, América do Sul e América Central (ANTUNES et al., 2009; CARVALHO-COSTA et al., 2009; NAKAGOMI et al., 2008; PATEL et al., 2009; GOUVEA et al., 2007; GOUVEA et al., 2009).

Segundo a literatura, o genótipo G2P[4] costuma predominar por dois ou três anos, seguido por um intervalo de 6 a 10 anos em que ele não circula ou é detectado esporadicamente; após esse "vácuo", pode então ressurgir causando surtos ou epidemias, já que durante o período de ausência, muitas crianças não tiveram contato natural e estão

desprotegidas contra este genótipo. A esta característica da circulação denominou-se "flutuação natural" do genótipo G2P[4] (BISHOP; UNICOMB; BARNES, 1991; TIMENETSKY et al., 1996; BERN et al., 1992; LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES et al., 2008). Desta forma, o predomínio deste genótipo nos anos de 2006, 2007 e 2008 em nosso estudo, poderia representar um reflexo de sua flutuação natural. Observamos ainda um alto percentual de infecção em crianças mais velhas (Tabela 4), que poderia ser consequência da re-emergência de RV do genótipo G2P[4] após um longo intervalo sem a sua circulação, infectando desta forma também crianças maiores que ainda não tinham tido contato com este vírus, e portanto, ainda susceptíveis.

Um outro fato interessante é que o aumento da circulação do genótipo G2P[4] ocorreu logo após o período da introdução da vacina monovalente (G1P[8]) contra RV no Calendário Básico de Imunização para Criança. Estudos mostraram que esta vacina é eficaz não só na proteção contra RV de genótipo G1P[8], mas também contra outros genótipos G associados ao P[8], tais como G3P[8], G4P[8], G9P[8]; no entanto, a sua eficiência contra o genótipo G2P[4] ainda não está bem definida (VESIKARI et al., 2004; SALINAS et al., 2005; RUIZ-PALACIOS et al., 2006, VESIKARI et al., 2007; LINHARES et al., 2008). Com isso, foram levantadas duas hipóteses para tentar explicar este aumento na circulação de G2P[4]: a primeira é que a vacina poderia estar protegendo contra os RV de genótipos G associados ao P[8], mas em menor proporção contra os RV de genótipo G2P[4], permitindo sua circulação; e a segunda, é que poderia ser um reflexo da flutuação natural deste genótipo, já que ele também predominou em países onde a vacina não foi introduzida (ANTUNES et al., 2009) ou mesmo em países utilizando a outra vacina pentavalente (PATEL et al., 2009).

A hipótese de flutuação natural do genótipo G2P[4] seria plausível para explicar sua emergência em 2006, seu predomínio durante três anos e sua ausência observada em 2009; no entanto, em 2010, este genótipo voltou a predominar na região, o que nos leva novamente a pensar na hipótese de seleção imune desencadeada pela vacina.

Não podemos afirmar que a vacina não tenha sido eficaz na proteção contra o genótipo G2P[4], já que infelizmente não possuímos informações sobre dados vacinais das crianças neste estudo. O que pudemos verificar foi que com base na data de coleta das amostras fecais e na idade, 47,3% das crianças infectadas por RV de genótipo G2P[4] eram elegíveis à vacinação (Tabela 9) e que em média os percentuais de cobertura vacinal para RV em Uberaba e Uberlândia foram respectivamente 85,39% e 86,55%, considerados muito satisfatórios (MS, 2010). Outro fato é que não detectamos nenhuma amostra homóloga à cepa

vacinal (G1P[8]), ou mesmo com outros genótipos associados ao P[8] (com exceção de uma amostra atípica em um caso de infecção mista) ao longo do período estudado.

Em continuação à análise dos dados de caracterização, foram detectados no período três RV de perfil longo em crianças mais velhas e não elegíveis a vacinação (Figuras 18 e 20). O primeiro deles foi em setembro de 2008 em Uberlândia, com genótipo G3P[8]+P[4]; o segundo em maio de 2009, em Uberaba, com genótipo G5+G10P[NT]; e o terceiro foi detectado um ano depois do primeiro em Uberlândia, com genótipo G3P[NT]. A detecção de mais de um genótipo em uma mesma amostra caracteriza um caso de infecção do hospedeiro por mais de um tipo viral, portanto, uma infecção mista. O genótipo G3 é um dos mais comumente detectados em mamíferos selvagens e animais domésticos, constantemente associado à transmissão interespecie; os genótipos G5 e G10, geralmente estão associados a infecções em porcos e bezerros, respectivamente. Genótipos G3, G5 e G10 têm sido associados a surtos de gastroenterites em humanos em diversas partes do mundo (ESTES; KAPIKIAN, 2007; SANTOS; HOSHINO, 2005; GENTSH et al., 2005; LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES, 2008); no Brasil, o tipo G5, já foi responsável por surtos de rotavirose na década de 90 (GOUVEA et al., 1994). Fora isso são encontrados em casos isolados, muitas vezes em misturas com outros RV e são conhecidos por representar reagrupamentos entre RV animais e humanos que estão co-circulando em uma região, ou mesmo uma transmissão direta de RV animal para o humano (GOUVEA; BRANTLY, 1995). Pode-se ainda ressaltar, a possibilidade de que a mistura de dois ou mais tipos de vírus em uma única amostra, possa representar um único vírus com dupla especificidade, como foi observado no Brasil um RV humano com especificidade dupla G5/G11 (TIMENETSKY et al., 1997). As misturas de amostras de RV são de grande importância epidemiológica, já que é dessa forma que surgem as novas combinações de vírus que por sua vez podem ser muito virulentos (GOUVEA; BRANTLY, 1995).

Os genótipos P de duas amostras, não puderam ser genotipados. Isto pode ter ocorrido devido à influência de algum inibidor presente na amostra ou porque estes vírus apresentam mutações na sequência de nucleotídeos na qual o iniciador específico deveria parear, impossibilitando a genotipagem. Não podemos descartar também a possibilidade de tratar-se de um vírus com nova especificidade genética. Estas amostras serão seqüenciadas para elucidarmos este fato.

Para podermos avaliar melhor o impacto da vacinação na epidemiologia dos RV é necessária a continuação deste estudo na região por um tempo maior.

7 CONCLUSÕES

- Os RV do grupo A foram detectados em 12,5% das amostras. A prevalência variou acentuadamente de um ano para o outro, sendo verificada uma diminuição significativa em 2009 e uma tendência de aumento em 2010;
- Observou-se a circulação de diferentes variantes de eletroferotipo curto, que representaram 95,9% das amostras e uma baixa circulação de RV de eletroferotipo longo (4,1%) nos três anos e meio do estudo;
- Verificou-se a circulação quase que exclusiva de RV do genótipo G2P[4] durante o período analisado;
- A detecção do RV do grupo A ocorreu nos meses de seca durante o inverno e foi maior em crianças internadas e na faixa etária entre 13 a 24 meses;
- Este estudo deve ser continuado para que possamos entender melhor o impacto da vacinação na epidemiologia dos RV na região do Triângulo Mineiro. Nossos dados contribuem para o entendimento da epidemiologia dos RV no País e fornecem subsídios para avaliações futuras sobre a adoção de medidas de controle e vacinação.

REFERÊNCIAS

Abe M, Ito N, Morikawa S, Takasu M, Murase T, Kawashima T, Kawai Y, Kohara J, Sugiyama M. Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. *Virus Res.* 2009;144(1-2):250-7.

Andreas MS, Batista SM, Tozetti IA, Ozaki CO, Nogueira MM, Fiaccadori FS, Borges AM, Santos RAT, Cardoso DDP. Rotavirus A among hospitalized infants, up to three years of age, with acute gastroenteritis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40(4):411-414.

Antunes H, Afonso A, Iturriza M, Martinho I, Ribeiro C, Rocha S, Magalhães C, Carvalho L, Branca F, Gray J. G2P[4] the most prevalent rotavirus genotype in 2007 winter season in an European non-vaccinated population. *J Clin Virol.* 2009;45(1):76-8.

Arias CF. Astroviruses. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. 5ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 2007. Cap.29, p.982-1000.

Armah GE, Sow SO, Breiman RF, Dallas MJ, Tapia MD, Feikin DR, Binka FN, Steele AD, Laserson KF, Ansah NA, Levine MM, Lewis K, Coia ML, Attah-Poku M, Ojwando J, Rivers SB, Victor JC, Nyambane G, Hodgson A, Schödel F, Ciarlet M, Neuzil KM. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2010;376(9741):606-14.

Azevedo AS, Yuan L, Jeong KI, Gonzalez A, Nguyen TV, Pouly S, Gochnauer M, Zhang W, Azevedo A, Saif LJ. Viremia and nasal and rectal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus. *J. Virol* 2005;79:5428–5436.

Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science.* 1996;272(5258):101-4.

BDI - Banco de Dados Integrados de Uberlândia. Secretaria Municipal de Planejamento Urbano e Meio Ambiente. 2008. Disponível em: <http://www3.uberlandia.mg.gov.br/midia/documentos/planejamento_urbano/bdi_2008_voll.pdf> Acesso em: 10 de out. de 2010.

Bern C, Unicomb L, Gentsch JR, Banul N, Yunus M, Sack RB, Glass RI. Rotavirus diarrhea in Bangladeshi children: correlation of disease severity with serotypes. *J Clin Microbiol.* 1992;30,3234-8.

- Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E, Lund JS. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *N Engl J Med*. 1983;309(2):72-6.
- Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*. 1973;2(7841):1281-3.
- Bishop RF, Unicomb LE, Barnes GL. Epidemiology of rotavirus serotypes in Melbourne, Australia, from 1973 to 1989. *J Clin Microbiol*. 1991;29:862-868.
- Bishop RF. Development of candidate rotavirus vaccines. *Vaccine*. 1993;11(2):247-54. Review.
- Bishop RF. Natural history of human rotavirus infection. *Arch Virol Suppl*. 1996;12:119-28. Review.
- Blutt SE, Matson DO, Crawford SE, Staat MA, Azimi P, Bennett BL, Piedra PA, Conner ME. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Med*. 2007;4(4):e121.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*. 1990;28(3):495-503.
- Boschi-Pinto C., Velebit L., Shibuya k. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. 2008. Disponível em:
<<http://www.who.int/bulletin/volumes/86/9/07-050054/en/print.html>>. Acesso em: 31 de jul. de 2009.
- Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Arrobio JO, Jeffries BC, Parrott RH. Rotavirus gastroenteritis and weather. *J Clin Microbiol*. 1982;16(3):478-82.
- Bridger JC. Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoea. *Vet Rec*. 1980;107(23):532-533.
- Cardoso DD, Soares CM, Dias e Souza MB, de Azevedo Mda S, Martins RM, Queiróz DA, de Brito WM, Munford V, Rácz ML. Epidemiological features of rotavirus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(1):25-9.

Carvalho-Costa, FA, Araújo IT, Assis RMS, Fialho AM, Martins CMMA, Bóia MN, Leite JPG. Rotavirus Genotype Distribution after Vaccine Introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 2009;15:95-97.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Rotavirus surveillance - worldwide, 2001-2008. 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5746a3.htm>>. Acesso em: 31 de jul. de 2009.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine-US, 1998-1999. *Ann Pharmacother*. 1999;33(9):1020-1.

Cheng AC, McDonald JR, Thielman NM. Infectious diarrhea in developed and developing countries. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39(9):757-73. Review.

Chouikha A, Fodha I, Ben Hadj Fredj M, Ardhaoui M, Teleb N, Brini I, Messaadi F, Mastouri M, Sfar T, Hachicha M, Kammoun T, Bouaaziz A, Amri F, Harbi A, Zribi M, Bousnina S, Khemakhem A, Boujaafar N, Trabelsi A, Steele AD. Relationship between electropherotypes and VP7/VP4 genotypes of group A rotaviruses detected between 2000 and 2007 in Tunisian children. *Pathol Biol (Paris)*. 2009 May 28. [Epub ahead of print]

Clark B, McKendrick M. A review of viral gastroenteritis. *Curr Opin Infect Dis*. 2004;17(5):461-9. Review.

Crawford SE, Patel DG, Cheng E, Berkova Z, Hyser JM, Ciarlet M, Finegold MJ, Conner ME, Estes MK. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. *J. Virol*. 2006;80:4820–4832.

Desselberger U. Genome rearrangements of rotaviruses. *Arch Virol Suppl*. 1996;12:37-51. Review.

Domingues ALS, da Silva Vaz MG, Moreno M, Câmara FP. Molecular epidemiology of group A rotavirus causing acute diarrhea in infants and young children hospitalized in Rio de Janeiro, Brazil, 1995-1996. *Braz J Infect Dis*. 2000;4(3):119-25.

Domingues ALS, Morais AT, Cruz RL, Moreira LP, Gouvêa VS. Rotavirus-associated infantile diarrhea in Uberaba, Minas Gerais, on the wake of the Brazilian vaccination program. *J Clin Virol* 2008;43(3):298-301.

Eichwald C, Rodriguez JF, Burrone OR. Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *J. Gen. Virol.* 2004; 85:625–634.

Esteban LE, Rota RP, Gentsch JR, Jiang B, Esona M, Glass RI, Glikmann G, Castello AA. Molecular epidemiology of group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina 2004-2007: reemergence of G2P[4] and emergence of G9P[8] strains. *J Med Virol.* 2010;82(6):1083-93.

Estes MK, Kapikian AZ. Rotaviruses. In: Knipe DM and Howley PM, editors-in-chief. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams; 2007. Cap.53, p.1917-74.

Estes MK. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. *Fields Virology*. 4 ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 2001. Cap.54, p.1747-1785.

Feneaux M, Cuadras MA, Feng N, Jaimes MC, Greenberg HB. Extra-intestinal spread and replication of homologous (EC) and a heterologous (RRV) rotavirus in BALB/c mice. *J Virol.* 2006;80(11): 5219-32.

Flewett TH, Davies H, Bryden AS, Robertson MJ. Diagnostic electron microscopy of faeces. II. Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. *J Clin Pathol.* 1974;27(8):608-14.

Gabbay YB, Mascarenhas JD, Linhares AC, Freitas RB. Atypical rotavirus among diarrhoeic children living in Belém, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1989;84(1):5-8.

Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30(6):1365-73.

Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, Jain V, Cunliffe NA, Nakagomi O, Kirkwood CD, Fischer TK, Parashar UD, Bresee JS, Jiang B, Glass RI. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis.* 2005;192 (1):146-59. Review.

Gentsch JR, Parashar UD, Glass RI. Impact of rotavirus vaccination: the importance of monitoring strains. *Future Microbiol.* 2009;4:1231-4.

Gouvea V and Brantly M. Is rotavirus a population of reassortants? *Trends Microbiol.* 1995;3:159-62.

Gouvea V, de Castro L, Timenetsky MCST, Greenberg H, Santos N. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J Clin Microbiol* 1994;32:1408-9.

Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol*. 1990a;28(2):276-82.

Gouvea V, Ho MS, Glass R, Woods P, Forrester B, Robinson C, Ashley R, Riepenhoff-Talty M, Clark HF, Taniguchi K, et al. Serotypes and electropherotypes of human rotavirus in the USA: 1987-1989. *J Infect Dis*. 1990b;162(2):362-7.

Gouvea V, Santos N, Timenetsky Mdo C. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol*. 1994a;32(5):1338-40.

Gouvea V, Santos N, Timenetsky Mdo C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *J Clin Microbiol*. 1994b;32(5):1333-7.

Gouvea V, Santos N. Molecular epidemiology of rotavirus in Brazil: A model for the tropics? *Virus Rev Res*. 1997;2:15-24.

Gouvea VS, Dias GS, Aguiar EA, Pedro AR, Fichman ER, Chinam ES, Gomes SP, Domingues ALS. Acute gastroenteritis in a pediatric hospital in Rio de Janeiro in pre- and post-rotavirus vaccination settings. *Open Virology J*. 2009;3,26-30.

Gouvea VS, Domingues ALS, Naveca FG, Pedro AR, Bevilacqua CC. Changing epidemiology of rotavirus-related hospitalizations in Rio de Janeiro, Brazil, from 2002 to 2006. *Open Virology J* 2007;1,47-50.

Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ. Human caliciviruses. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. 4 ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 2001. Cap.27, p. 841-874.

Green KY. Caliciviridae: The Noroviruses. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. 5ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 2007. Cap.28, p.950-79.

Greenberg HB. Immunity against rotavirus disease. Abstract, International Rotavirus Symposium, 6 Jul, Mexico City, Mexico, 2004.

Gurgel RG, Bohland AK, Vieira SC, Oliveira DM, Fontes PB, Barros VF, Ramos MF, Dove W, Nakagomi T, Nakagomi O, Correia JB, Cunliffe N, Cuevas LE. Incidence of rotavirus and all-cause diarrhea in northeast Brazil following the introduction of a national vaccination program. *Gastroenterology*. 2009;137(6):1970-5.

Guyton AC, Hall JE. Funções Secretoras do Trato Alimentar. In: _____. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. Cap.64, p.791-807.

Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 1982;16:473-7.

Holmes IH. Development of rotavirus molecular epidemiology: electropherotyping. *Arch Virol Suppl*. 1996;12:87-91. Review.

Hung T, Chen GM, Wang CG, Yao HL, Fang ZY, Chao TX, Chou ZY, Ye W, Chang XJ, Den SS, et al. Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet*. 1984;1(8387):1139-42.

Hyser JM, Estes MK. Rotavirus vaccines and pathogenesis: 2008. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009;25(1):36-43. Review.

IAL - Instituto Adolfo Lutz - Centro de Vigilância Epidemiológica “Professor Alexandre Vranjac”. Diarréia e rotavírus. *Rev. de Saúde Pública*. 2004; 38(6):844-5.

Iturriza-Gomara M, Green J, Brown DWG, Desselberger U, Gray J. Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: implications for reverse transcription-PCR genotyping. *J Clin Microbiol* 2000; 38:898–901.

Jiang B, Dennehy PH, Spangenberg S, Gentsch JR, Glass RI. First detection of group C rotavirus in fecal specimens of children with diarrhea in the United States. *J Infect Dis* 1995;172:45-50.

Kane EM, Turcios RM, Arvay ML, Garcia S, Bresee JS, Glass RI. The epidemiology of rotavirus diarrhea in Latin America. Anticipating rotavirus vaccines. *Rev Panam Salud Publica*. 2004;16(6):371-7. Review.

Kapikian AZ. Viral gastroenteritis. *JAMA*. 1993;269(5):627-30.

Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ.* 2003;81(3):197-204. Review.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.

Leite JP, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103(8):745-53.

Linhares AC, Araújo EC, Justino MCA. Rotavírus. In: Coura JR. *Dinâmica Das Doenças Infecciosas e Parasitárias.* 1ed. Guanabara Koogan, 2005. Cap.16, p.1857-1876.

Linhares AC, Pinheiro FP, Schmetz C, Müller G, Peters D. [Duovirus (Rotavirus) in Belém, State of Para, Brazil (preliminary report)]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1977;19(4):278-9.

Linhares AC, Velázquez FR, Pérez-Schael I, Sáez-Llorens X, Abate H, Espinoza F, López P, Macías-Parra M, Ortega-Barría E, Rivera-Medina DM, Rivera L, Pavía-Ruz N, Nuñez E, Damaso S, Ruiz-Palacios GM, De Vos B, O'Ryan M, Gillard P, Bouckennooghe A; Human Rotavirus Vaccine Study Group. Efficacy and safety of an oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Lancet.* 2008;371(9619):1181-9.

Linhares AC. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. *Cad. Saúde Pública.* 2000;16(3):629-646.

Linhares AC. Rotavirus Infection in Brazil: Epidemiology, Immunity, and Potential Vaccination. *Braz J Infect Dis.* 1997;1(6):284-293.

Long-Croal LM, Wen X, Ostlund EN, Hoshino Y. Concentration of acrylamide in a polyacrylamide gel affects VP4 gene coding assignment of group A equine rotavirus strains with P[12] specificity. *Virol J.* 2010;7:136.

Lovmar, Lovisa, Fock, Caroline, Espinoza, Felix, Bucardo, Filemon, Syvanen, Ann-Christine, Bondeson, Kare. Microarrays for Genotyping Human Group A Rotavirus by Multiplex Capture and Type-Specific Initiator Extension *J Clin Microbiol* 2003; 41:5153-5158.

Magalhães GF, Nogueira PA, Grava AF, Penati M, Silva LH, Orlandi PP. Rotavirus and adenovirus in Rondônia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Aug;102(5):555-7.

- Malik J, Gupta SK, Bhatnagar S, Bhan MK, Ray P. Evaluation of IFN-gamma response to rotavirus and non-structural protein NSP4 of rotavirus in children following severe rotavirus diarrhea. *J Clin Virol.* 2008;43(2):202-6.
- Matsuno S, Hasegawa A, Kalica AR, Kono R. Isolation of a recombinant between simian and bovine rotaviruses. *J Gen Virol.* 1980;48(1):253-6.
- Matthijnssens J, Bilcke J, Ciarlet M, Martella V, Bányai K, Rahman M, Zeller M, Beutels P, Van Damme P, Van Ranst M. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol.* 2009;4:1303-16. Review.
- Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Patton JT, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Desselberger U, Van Ranst M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol.* 2008;153(8):1621-9.
- Maunula L, Von Bonsdorff CH. Frequent reassortments may explain the genetic heterogeneity of rotaviruses: analysis of Finnish rotavirus strains. *J Virol.* 2002;76(23):11793-800.
- Montenegro FM, Correia JB, Rodrigues Falbo A, Dove W, Nakagomi T, Nakagomi O, Cuevas LE, Cunliffe NA, Hart CA. Anticipating rotavirus vaccines in Brazil: detection and molecular characterization of emerging rotavirus serotypes G8 and G9 among children with diarrhoea in Recife, Brazil. *J Med Virol.* 2007;79(3):335-40.
- Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Costa FF, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C. Characterization of rotavirus strains from day care centers: pre- and post-rotavirus vaccine era. *J Pediatr (Rio J).* 2010;86(2):155-8.
- MS - Ministério da Saúde - Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. Indicadores e dados básicos. 2007. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2007/c06.def>>. Acesso em: 16 de ago. 2008.
- MS - Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença diarreica por RV: vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de RV humano - VORH. 2006. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_rotavirus_02_03_2006.pdf>. Acesso em: 15 de set. 2006.

MS – Ministério da Saúde. Sistema de Avaliação do Programa de Imunização – API. 2010. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?pn/cnv/cpning.def>. Acesso em: 10 de outubro de 2010.

Nakagomi O, Nakagomi T, Akatani K, Ikegami N. Identification of rotavirus genogroups by RNA-RNA hybridization. *Mol Cell Probes*. 1989;3(3):251-61.

Nakagomi T, Cuevas LE, Gurgel RG, Elrokhsi SH, Belkhir YA, Abugalia M, Dove W, Montenegro FM, Correia JB, Nakagomi O, Cunliffe NA, Hart CA. Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. *Arch Virol* 2008;153(3):591-3.

Oishi I, Yamazaki K, Minekawa Y. An occurrence of diarrheal cases associated with group C rotavirus in adults. *Microbiol Immunol* 1993;37: 505-9.

Pai CH, Shahrabadi MS, Ince B. Rapid diagnosis of rotavirus gastroenteritis by a commercial latex agglutination test. *J Clin Microbiol*. 1985;22(5):846-50.

Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(2):304-6.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(5):565-72.

Patel M, Pedreira C, De Oliveira LH, Tate J, Orozco M, Mercado J, Gonzalez A, Malespin O, Amador JJ, Umaña J, Balmaseda A, Perez MC, Gentsch J, Kerin T, Hull J, Mijatovic S, Andrus J, Parashar U. Association between pentavalent rotavirus vaccine and severe rotavirus diarrhea among children in Nicaragua. *JAMA* 2009;301(21):2243-51.

Penaranda ME, Cubitt WD, Sinarachatanant P, Taylor DN, Likanosakul S, Saif L, Glass RI. Group C rotavirus infection in patients with diarrhea in Thailand, Nepal, and England. *J Infect Dis*. 1989;160: 392-397.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP, Candeias JA, RácZ ML, Linhares AC, Gabbay YB, Trabulsi JR. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. *J Hyg (Lond)*. 1983;90(1):117-25.

PMU - Prefeitura Municipal de Uberaba. Secretaria de Desenvolvimento Econômico e Turismo. Uberaba em dados. 2009. Disponível em: <http://www.uberaba.mg.gov.br/portal/conteudo,232>. Acesso em: 08 de outubro de 2010.

Ramig RF. Genetics of the rotaviruses. *Annu Rev Microbiol.* 1997;51:225-55.Review.

Rasool NBG, Hamzah M, Jegathesan M, Wong YH, Qian Y, Green KY. Identification of a human group C rotavirus in Malaysia. *J Med Virol* 1994;43:209-11.

Ribeiro LR, Giuberti RSO, Barreira DMPG, Saick KW, Leite JPG, Miagostovich MP, Spano LC. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103(2): 201-206.

Rosa e Silva ML, Carvalho IP, Gouvea V. 1998-1999 Rotavirus seasons in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil: detection of na unusual G3P[4] epidemic strain. *J Clin Microbiol* 2002;40:2837-42.

Ross J, Ostlund EN, Cao D, Tatsumi M, Hoshino Y. Acrylamide concentration affects the relative position of VP7 gene of serotype G2 strains as determined by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Clin Virol.* 2008;42(4):374-80.

Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, Cheuvart B, Espinoza F, Gillard P, Innis BL, Cervantes Y, Linhares AC, López P, Macías-Parra M, Ortega-Barría E, Richardson V, Rivera-Medina DM, Rivera L, Salinas B, Pavía-Ruz N, Salmerón J, Rüttimeann R, Tinoco JC, Rubio P, Nuñez E, Guerrero ML, Yarzabal JP, Damaso S, Tornieporth N, Sáez-Llorens X, Vergara RF, Vesikari T, Bouckennooghe A, Clemens R, De Vos B, O'Ryan M; Human Rotavirus Vaccine Study Group. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 2006;354(1):11-22.

Salinas B, Pérez Schael I, Linhares AC, Ruiz Palacios GM, Guerrero ML, Yarzabal JP, Cervantes Y, Costa Clemens S, Damaso S, Hardt K, De Vos B. Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy of an attenuated rotavirus vaccine, RIX4414: A randomized, placebo-controlled trial in Latin American infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24(9):807-16.

Sanekata T, Ahmed MU, Kader A, Taniguchi K, Kobayashi N. Human group B rotavirus infections cause severe diarrhea in children and adults in Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 2003 May;41(5):2187-90.

Santos JS, Alfieri AF, Leite JPG, Skraba I, Alfieri AA. Molecular Epidemiology of the Human Group A Rotavirus in the Paraná State, Brazil. *Braz Arch Biol Technol.* 2008; 79(2):287-94.

Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* 2005;15(1):29-56. Review.

Sartori AM, Valentim J, de Soárez PC, Novaes HM. Rotavirus morbidity and mortality in children in Brazil. *Rev Panam Salud Publica*. 2008;23(2):92-100. Review.

Teixeira JMS, Figueiredo RB, Santos HMP, Ferreira MNR, Câmara GNNL. Aspectos epidemiológicos da infecções por rotavírus no Distrito Federal, Brasil / Epidemiologic aspects of rotavirus infections in the Federal District, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1991;24(4):223-30.

Timenetsky Mdo C, Gouvea V, Santos N, Alge NE, Kisielius JJ, Carmona RC. Outbreak of severe gastroenteritis in adults and children associated with type G2 rotavirus. *J Diarrh Dis Res* 1996; 14:71-74.

Timenetsky Mdo C, Gouvea V, Santos N, Carmona RC, Hoshino Y. A novel human rotavirus serotype with dual G5-G11 specificity. *J Gen Virol*. 1997;78(6):1373-8.

UNICEF - United Nations Children's Fund; WHO - World Health Organization. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done. 2009. Disponível em: < http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241598415_eng.pdf > Acesso em: 02 out. 2010.

Ushijima H, Honma H, Mukoyama A, Shinozaki T, Fujita Y, Kobayashi M, Ohseto M, Morikawa S, Kitamura T. Detection of group C rotavirus in Tokyo. *J Med Virol* 1989;27:299-303.

Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, Glass RI, Estes MK, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med*. 1996;335(14):1022-8.

Vesikari T, Karvonen A, Prymula R, Schuster V, Tejedor JC, Cohen R, Meurice F, Han HH, Damaso S, Bouckenoghe A. Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, double-blind controlled study. *Lancet* 2007;370(9601):1757-63.

Vesikari T, Karvonen A, Puustinen L, Zeng SQ, Szakal ED, Delem A, De Vos B. Efficacy of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in Finnish infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23(10):937-43.

Von Bonsdorf CH, Svensson L. Human serogroup C rotavirus in Finland. *Scand J Infect Dis*. 1988;20(5):475-8.

Waisbourd-Zinman O, Ben-Ziony S, Solter E, Chodick G, Ashkenazi S, Livni G. The percentage of nosocomial-related out of total hospitalizations for rotavirus gastroenteritis and its association with hand hygiene compliance. *Am J Infect Control*. 2010 Sep 22. [Epub ahead of print].

Ward RL, Kapikian AZ, Goldberg KM, Knowlton DR, Watson MW, Rappaport R. Serum rotavirus neutralizing-antibody titers compared by plaque reduction and enzyme-linked immunosorbent assay-based neutralization assays. *J Clin Microbiol*. 1996;34(4):983-5.

Webb A, Starr M. Acute gastroenteritis in children. *Aust Fam Physician*. 2005;34(4):227-31. Review.

WHO - World Health Organization. The global burden of disease: 2004 update. 2008.

Disponível em:

<http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf> Acesso em: 02 out. 2010.

Wold WSM, Horwitz MS. Adenoviruses. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. 5ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 2007. Cap.64, p.2396-436.

Worobey M, Holmes EC. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol*. 1999;80(10):2535-43. Review.

Yolken RH, Barbour B, Wyatt RG, Kalica AR, Kapikian AZ, Chanock RM. Enzyme-linked immunosorbent assay for identification of rotaviruses from different animal species. *Science*. 1978;201(4352):259-62.

Zaman K, Dang DA, Victor JC, Shin S, Yunus M, Dallas MJ, Podder G, Vu DT, Le TP, Luby SP, Le HT, Coia ML, Lewis K, Rivers SB, Sack DA, Schödel F, Steele AD, Neuzil KM, Ciarlet M. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2010;376(9741):615-23.

Zuccotti G, Meneghin F, Dilillo D, Romanò L, Bottone R, Mantegazza C, Giacchino R, Besana R, Ricciardi G, Sterpa A, Altamura N, Andreotti M, Montrasio G, Macchi L, Pavan A, Paladini S, Zanetti A, Radaelli G. Epidemiological and clinical features of rotavirus among children younger than 5 years of age hospitalized with acute gastroenteritis in Northern Italy. *BMC Infect Dis*. 2010;10:218.

ANEXO I: Folha de aprovação do Comitê de Ética**DECLARAÇÃO**

Declaramos para os devidos fins que o Projeto denominado EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E DIVERSIDADE GENÉTICA DE AGENTES VIRAIS DA GASTROENTERITE INFANTIL NO TRIÂNGULO MINEIRO, MINAS GERAIS, de autoria do pesquisador André Luiz da Silva Domingues, protocolado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro sob o nº 672, foi submetido à análise do ponto de vista ético e considerado aprovado e de acordo com a legislação pertinente em reunião do CEP do 05 de maio de 2006 e teve extensão (inclusão de outros agentes virais de importância para as gastroenterites infantis) aprovada em 30 de abril de 2009.

Declaramos também que o título do projeto que foi protocolado inicialmente, em 16-02-2009 era CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ROTAVÍRUS ASSOCIADOS A SÍNDROMES DIARREICAS INFANTIS, NA CIDADE DE UBERABA, MINAS GERAIS.

Uberaba, 06 de julho de 2009.

Maria José Campos de Sousa
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa de UFTM

ANEXO II : Preparo de soluções

1.0 Soluções para extração

1.1 Tampão Fosfato Salina (PBS) 1% (pH 7,4)

Cloreto de sódio	4g
Cloreto de potássio	0,1g
Hidrogênio fosfato de sódio anidro	1,2g
Dihidrogênio fosfato de potássio anidro	0,2g
Água destilada quantidade suficiente para (q.s.p.)	500mL

Em béquer de 1000mL foram adicionados os reagentes, diluídos em 400mL de água destilada, homogeneizados com agitador magnético e ajustado o pH para 7,4 com ácido clorídrico (HCl) PA 36,5 a 38% (v/v) antes de completar o volume final em balão volumétrico de 500mL. A solução foi transferida para um frasco com vedação, autoclavada a 121°C por 15 minutos e armazenada entre 2 e 4 °C.

1.2 Tampão Tris-HCl 0,1 M (pH= 6,4)

Tris- hidroximetil-tris-aminometano	1,21g
Água destilada q.s.p.	100mL

Em béquer de 250mL foram adicionados o Tris e 80mL de água destilada. A solução foi homogeneizada com agitador magnético e o pH ajustado para 6,4 HCl PA antes de completar o volume final em balão volumétrico de 100mL. O conteúdo foi transferido para um frasco com vedação, autoclavado a 121°C por 15 minutos e armazenado entre 2 e 4 °C.

1.3 EDTA 0,2M (pH=8,0)

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético	0,744g
Água destilada q.s.p.	10mL

Em béquer de 100mL foram adicionados o EDTA e 8mL de água destilada. A solução foi agitada com agitador magnético e o pH ajustado para 8,0 com hidróxido de sódio NaOH 1N. A solução foi transferida para um balão volumétrico, ajustado o volume final e armazenada a 22-25°C em um frasco com tampa.

1.4 Tampão L6

Isotiocianato de Guanidina (GITC)	12g
EDTA 0,2M (pH=8,0)	2,2mL

Triton X-100	0,24mL
Tris-HCl 0,1M (pH= 6,4) q.s.p.	10mL

Em béquer de 100mL foram adicionados os reagentes, diluídos em 5mL de Tris HCL 0,1M (pH=6,4), homogeneizados com agitador magnético, transferido para um balão volumétrico e completado o volume final para 10mL. A solução foi transferida para um frasco âmbar e armazenada entre 22 e 25°C. A solução é estável por pelo menos três semanas.

1.5 Tampão L2

Isotiocianato de Guanidina (GITC)	12g
Tris-HCl 0,1M (pH= 6,4) q.s.p.	10mL

Em béquer de 100mL foram adicionados os reagentes, diluídos em 5mL de Tris HCL 0,1M (pH=6,4), homogeneizados com agitador magnético, transferido para um balão volumétrico e completado o volume final para 10mL. A solução foi transferida para um frasco âmbar e armazenada entre 22 e 25°C. A solução é estável por pelo menos três semanas.

1.6 Sílica

Sílica (SIGMA®)	60g
Água destilada q.s.p.	500mL

Em uma proveta de 500mL foram adicionadas água e 60g de sílica. Homogeneizou-se a solução vertendo-se a proveta, deixando sedimentar por 24 horas. Foram desprezados 430mL do sobrenadante e adicionados 500mL de água destilada à sílica. Após sedimentação por 5 horas, foram desprezados 440mL de sobrenadante. O pH foi ajustado para 2,0 com 600µL de HCl 37%. A solução foi alíquotada em microtubos de 5mL e, autoclavada a 121°C por 15 minutos e estocada protegida da luz entre 22-25°C. A solução é estável por pelo menos seis meses.

1.7 Álcool 70%

Álcool etílico PA	35,85mL
Água destilada	13,15mL

Em proveta de 100mL foram pipetados 35,85mL de álcool e 13,15mL de água destilada. O conteúdo foi homogeneizado por inversão e transferido para frasco com tampa e conservado entre 2 e 4°C.

1.8 Acetona PA

Pronta para uso

2.0 Soluções para gel de poliacrilamida

2.1 Soluções para o preparo do gel

2.1.1 Acrilamida 30%

Acrilamida	29,2g
Bisacrilamida.	0,8g
Água destilada q.s.p.	100mL

Em béquer de 250mL foram adicionados os reagentes, diluídos em 80mL de água destilada, homogeneizados com agitador magnético e completado o volume final em balão volumétrico de 100mL. A solução foi filtrada com filtro milipore (0,22micron) e armazenada a 4°C protegido da luz por no máximo um mês. A solução é tóxica, portanto foi preparada utilizando luva, máscara e óculos.

2.1.2 Tampão Tris-HCl 1,5mM pH 8,8

Tris	18,15 g
Água destilada q.s.p.	100mL

Em béquer de 250mL foram adicionados o Tris e 80mL de água destilada. A solução foi homogeneizada com agitador magnético e o pH ajustado para 8,8 com HCl PA antes de completar o volume final em balão volumétrico de 100mL. O conteúdo foi transferido para um frasco com vedação, autoclavado a 121°C por 15 minutos e armazenado entre 2 e 4 °C.

2.1.3 Tampão Tris-HCl 0,5mM pH 6,8

Tris	6g
Água destilada q.s.p.	100mL

Em béquer de 250mL foram adicionados o Tris e 80mL de água destilada. A solução foi homogeneizada com agitador magnético e o pH ajustado para 6,8 com HCl PA antes de completar o volume final em balão volumétrico de 100mL. O conteúdo foi transferido para um frasco com vedação, autoclavado a 121°C por 15 minutos e armazenado entre 2 e 4 °C.

2.1.4 Duodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%

SDS	5g
Água destilada q.s.p.	50mL

Em béquer de 100mL foram adicionados o SDS e 40mL de água destilada. A solução foi homogeneizada com agitador magnético e em um balão volumétrico o volume final foi completado para 50mL. O conteúdo foi transferido para um frasco com vedação, autoclavado a 121°C por 15 minutos e armazenado entre 2 e 4°C.

2.1.6 Persulfato de amônio a 10%

Persulfato de amônia	1g
Água destilada q.s.p.	10mL

Em béquer de 50mL foram adicionados o persulfato de amônio e 8mL de água destilada. A solução foi homogeneizada com agitador magnético e o volume final foi completado para 10mL. A solução foi filtrada com filtro milipore (0,22micron), aliqotada em microtubos e estocada a -20°C.

2.1.7 Tetrametiletenodiamina (TEMED)

Pronto para uso

2.1.8 Preparo da solução do gel de poliacrilamida

Os reagentes devem ser adicionados na ordem mostrada no quadro abaixo, homogeneizados e imediatamente vertidos entre as placas montadas na cuba.

Solução	Gel 7,5% (mL)	Gel 4% (mL)
Água Mili-Q autoclavada	4,8	3
Acrilamida 30%	2,5	0,65
Tris-HCL 1,5M pH=8,8	2,5	-
Tris-HCL 0,5M pH=6,8	-	1,25
SDS 10%	0,1	0,05
Azul de bromofenol saturado	-	0,03
Persulfato de amônio 10%	0,1	0,05
TEMED	0,01	0,005
Total	10,01	5,035

2.2 Soluções para corrida

2.2.1 Azul de bromofenol 0,05% (p/v)

Azul de bromofenol	0,5g
Água destilada q.s.p.	10mL

Em béquer de 50mL foram adicionados o azul de bromofenol e 8mL de água destilada. A solução foi homogeneizada com agitador magnético e o volume final foi completado para 10mL. A solução foi filtrada com filtro milipore (0,22micron) e estocada entre 2 e 4°C protegida da luz.

2.2.2 Tampão de tratamento das amostras (4x)

Água destilada	4mL
Tris-HCL 0,5M (pH=6,8)	1mL
Glicerol	800µL
SDS 10%	1,6mL
2-β-mercaptoetanol	400µL
Azul de bromofenol 0,05% (p/v)	200µL

Todos os reagentes foram pipetados em um frasco estéril. A solução foi homogeneizada, filtrada com filtro milipore (0,22micron), alíquotada em microtubos e estocar entre 2 e 8°C protegida da luz.

2.2.3 Tampão de corrida 10X (Tris Glicina)

Tris	12g
Glicina	57,64g
SDS	4g
Água destilada q.s.p.	400mL

Em béquer de 1000mL foram adicionados os reagentes e 300mL de água destilada. A solução foi homogeneizada com agitador magnético e o volume final foi completado para 400mL. A solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos e estocada entre 2 e 4°C.

2.2.4 Tampão de corrida 1X

Diluir o tampão de corrida 10 vezes.

2.3 Soluções para coloração do gel

2.3.1 Solução fixadora

Álcool etílico PA	100mL
Ácido acético glacial PA	5mL
Água destilada autoclavada q.s.p.	1000mL

Em um balão volumétrico de 1000mL foram pipetados os reagentes e completado com água para o volume final de 1000mL. A solução foi transferida para um frasco com vedação e estocada entre 2 e 4°C.

2.3.2 Solução de nitrato de prata

Nitrato de prata	0,16g
Água destilada autoclavada na q.s.p.	100mL

Em béquer de 200mL foram adicionado o nitrato de prata e 90mL de água destilada. A solução foi transferida para um balão volumétrico e o volume final completado. A solução foi homogeneizada e utilizada. Esta solução não pode ser estocada.

2.3.3 Solução reveladora

Formaldeído PA	750 μ L
NaOH 7,5M	10mL
Água destilada autoclavada q.s.p.	100mL

Em um balão volumétrico de 100mL foram pipetados os reagentes e completado com água para o volume final de 100mL. A solução foi homogeneizada e utilizada. Esta solução não pode ser estocada.

2.3.4 Solução neutralizante

Ácido acético glacial PA	50mL
Água destilada autoclavada q.s.p.	1000mL

Em um balão volumétrico de 1000mL foi pipetado o ácido acético e completado com água para o volume final de 1000mL. A solução foi transferida para um frasco com vedação e estocada entre 2 e 4°C.

2.3.5 Solução de hidróxido de sódio 7,5M

NaOH	150g
Água destilada autoclavada q.s.p.	500mL

Em um béquer o NaOH foi dissolvido em 400mL de água. A solução foi homogeneizada com agitador magnético e o volume final foi completado para 500mL, em um balão volumétrico. A solução foi transferida para um frasco de plástico com vedação e estocada entre 22 e 25°C.

2.3.6 Formaldeído

Pronto para uso

3.0 Soluções para o gel de agarose

3.1 Tampão Tris-boro-EDTA (TBE) 10X pH=8,4

Tris	26,95g
Ácido Bórico	13,75g
EDTA	1,86g
Água destilada q.s.p.	250mL

Em um béquer de 500mL foram adicionados os reagentes e 200mL de água. A solução foi homogeneizada com agitador magnético. O conteúdo foi transferido para um balão volumétrico e completado o volume final e transferido para um frasco com vedação. A solução final foi estacada entre 2 e 4°C.

3.2 Tampão Tris-boro-EDTA (TBE) 0,5X

Diluir 1/20 o tampão TBE 10X

3.3 Gel de agarose a 1%

Agarose	1,0g
Tampão TBE 0,5X pH=8,4	100ml

A agarose foi pesada, colocada em um balão de 500mL e foi adicionado TBE 0,5X em quantidade suficiente para 100mL de solução. A solução foi aquecida em forno microondas até que a agarose fosse dissolvida.

3.4 Loading buffer

Em um tubo do tipo *Falcon* de 10mL foram misturados:

Glicerol	5mL
EDTA	0,04g

Água estéril q.s.p. 5mL

O pH foi acertado para 8.0 e posteriormente foi adicionada 0,025g de azul de bromofenol. A solução foi homogeneizada, aliqüotada em microtubos de 1,5mL e armazenar entre 2 e 8°C protegido da luz.

4.0 Oligonucleotídeos:

Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR foram descritos nos trabalhos de Gouvea et al. (1990a), Gouvea, Santos & Timenetsky (1994a e 1994b) e Gentsch et al. (1992), com a modificação na seqüência do iniciador 1T-1, descrita por Iturriza-Gómara et al. (2000).

As soluções foram preparadas a partir de oligonucleotídeos na concentração 200µM, que foram diluídos para a concentração final de 10µM.

4.1 Soluções de oligonucleotídeos:

- a) RT-G: 5µl de Beg9 + 5µ de End9 + 90µl de água de vacina
- b) RT-P: 5µl de con3 + 5µl de con2 + 90µl de água de vacina
- c) Gh: 5µl de RVG9 + 5µl de aBT1 + 5µl de aDT4 + 5µl de aAT8 + 5µl de aFT9 + 5µl de aCT2 + 5µl de aET3 + 65µl de água de vacina
- d) Ph: 5µl de con3 + 5µl de 1T1-D + 5µl de 2T-1 + 5µl de 3T-1 + 5µl de 4T-1 + 5µl de 5T-1 + 5µl de 6T-1 + 65µl de água de vacina
- e) Ga: 5µl de sBeg9 + 5µl de HT8 + 5µl de BT11 + 5µl de DT6 + 5µl de ET10 + 5µl de FT5 + 5µl de 70µl de água de vacina
- f) Pa: 5µl de pNCDV + 5µl de pUK + 5µl de pOSU + 5µl de pGott + 5µl de pB223 + 5µl de CON2 + 70 de água de vacina

5.0 Soluções da reação de RT:

Tabela 10: Solução da reação de RT para detecção e genotipagem de RV humanos e animais.

Reagente	Concentração	Volume (µL)/reação
Água pura	-	4,45
Tampão de PCR sem MgCl ₂	5X	4
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂)	25mM	4,8
dNTP: dATP, dCTP, dGTP e dTTP	10mM	0,75
Transcriptase reversa (IMPROM-II - Promega) 100 reações	-	1
Total	-	15

6.0 Soluções da reação de PCR:

Tabela 11: Solução da reação de amplificação (PCR) para detecção e genotipagem de RV humanos e animais.

Reagente	Concentração	Volume (µL)/reação
Água pura	-	18,05
Tampão de PCR sem MgCl ₂	10X	2,5
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂)	50mM	0,75
dNTP: dATP, dCTP, dGTP e dTTP	10mM	0,5
Solução de oligonucleotídeo RT-G ou RT-P	10µM	0,5
Platinum Taq (Invitrogen)	5U/µL	0,2
Total	-	22,5

7.0 Soluções da reação de genotipagem:

Tabela 12: Solução da reação de genotipagem de RV humanos e animais.

Reagente	Concentração	Volume (µL)/reação
Água pura	-	16,8
Tampão de PCR sem MgCl ₂	10X	2,5
DMSO	-	1,75
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂)	50mM	0,75
dNTP: dATP, dCTP, dGTP e dTTP	10mM	0,5
Solução de oligonucleotídeo Gh ou Ph ou Ga ou Pa	10µM	0,5
Platinum Taq (Invitrogen)	5U/µL	0,2
Total	-	23