

**JUCÉLIA STADINICKI DOS SANTOS**

**EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO DOS GENOTIPOS P (VP4) E G (VP7) DE  
*ROTAVIRUS* GRUPO A HUMANO NO ESTADO DO PARANÁ, 2000-2003.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

**Curitiba**

**2005**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia pelo Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Microbiologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná, sob a orientação do Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa, abaixo relacionados:

CAPES – Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Fundação Araucária (FAP/PR)

***Ao meu esposo, Aliatar, que conduziu  
de forma admirável todo esse percurso e que  
sempre será minha fonte constante  
de amor e incentivo.***

## **AGRADECIMENTOS**

Ao finalizar este estudo agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para sua realização, e, de maneira especial:

Ao Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri, pela oportunidade deste novo aprendizado e pela confiança e incentivo constantes no decorrer da pesquisa, que tornaram a orientação um meio de crescimento profissional e pessoal.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Vanete Thomaz Soccol, coordenadora do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná, por sua constante e inestimável dedicação ao curso.

Ao Prof. Yasuyoshi Hayashi, imensurável fonte de sabedoria, responsável por inspirar meus estudos e interesse pelos vírus.

Ao Laboratório Central do Paraná (LACEN), que disponibilizou as amostras clínicas que viabilizaram esta pesquisa científica, na pessoa da responsável técnica pelo Laboratório de Virologia, Irene Skraba, que sempre esteve presente auxiliando com carinho e atenção.

Ao Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina, local onde toda a pesquisa foi realizada, e também aos funcionários, estagiários e pós-graduandos.

Ao SIMEPAR, por ter disponibilizado dados meteorológicos incluídos no estudo.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Alice Fernandes Alfieri, por suas palavras de encorajamento e entusiasmo.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Lozovei, pelo incentivo e amabilidade.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Eni Bompeixe, pelo sorriso e carinho, constantemente dedicados em cada encontro.

Aos colegas do Programa de Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pelo convívio e atividades que realizamos durante o curso.

Aos funcionários do Departamento de Patologia Básica, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, pela atenção dispensada durante todo o período do curso.

À Suzana Kroeff, pelos materiais bibliográficos emprestados e pela atenção e interesse que sempre demonstrou com o presente estudo.

À Kerlei Médici, Dalíria do Prado e Maria Yoshikawa, técnicas do Laboratório de Virologia Animal, da UEL, que sempre estiveram presentes, auxiliando em todas as etapas do desenvolvimento do trabalho, além de dedicarem carinho e palavras de incentivo e amizade, durante todo o processo, e que certamente foram fundamentais para a conclusão da pesquisa.

Aos demais colegas do Laboratório de Virologia Animal da UEL, entre eles, Elisabete Takiuchi, Fabiana Rufino, Juliana Dias e Danilo Stipp, pelo convívio e auxílio prestados.

À Daniela Bergamin, colega do Laboratório de Virologia Animal da UEL, pelo auxílio permanente, amizade e carinho.

À Bruna e Franciele, pelo auxílio, hospitalidade e convivência em Londrina.

A todos meus familiares, pelo apoio e carinho recebidos nos bons e difíceis momentos desse percurso.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 OBJETIVOS.....	3
1.1.1 Objetivo geral.....	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
2.1 EPIDEMIOLOGIA DAS DIARRÉIAS INFANTIS.....	4
2.2 ROTAVÍRUS.....	5
2.2.1 Histórico.....	5
2.2.2 Morfologia dos Rotavírus.....	6
2.2.3 Estrutura genômica .....	9
2.2.4 Ciclo de Replicação.....	10
2.2.5 Sorogrupos e Subgrupos.....	12
2.2.6 Sorotipos e Genotipos.....	13
2.2.7 Transmissão e Patogenia das Rotaviroses.....	14
2.3 EPIDEMIOLOGIA GLOBAL DAS ROTAVIROSES.....	16
2.4 IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DA GENOTIPAGEM .....	19
<b>3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	<b>21</b>
RESUMO.....	22
ABSTRACT .....	23
INTRODUÇÃO .....	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	26
RESULTADOS .....	29
DISCUSSÃO .....	33
AGRADECIMENTOS .....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>45</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>59</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>89</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

bd - bidestilada

DNA - ácido desoxiribonucleico

dNTP - deoxinucleotídeo trifosfatado

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EGPA - Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE: *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

EIARA - Ensaio imunoenzimático para rotavírus e adenovírus

gp - glicoproteína

LACEN-PR - Laboratório Central do Estado do Paraná

mM - milimolar

N-PCR – *Nested* PCR

NSP - proteína não estrutural (*Non-Structural Protein*)

ORF - Região aberta de leitura (*Open Reading Frame*)

pb - pares de base (*base pairs*)

PBS - tampão salina - fosfato

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

pmol - picomol

pH - potencial hidrogeniônico

q.s.p. – quantidade suficiente para

RNA - ácido ribonucleico

RNAfd - ácido ribonucleico fita dupla

RT - Transcrição Reversa (*Reverse Transcription*)

RV gp A - rotavírus grupo A

VP - proteína viral (*Viral Protein*)

SDS - dodecil sulfato de sódio

TBE - tampão Tris-Borato-EDTA

TRIS - hidroximetil aminometano

μL - Microlitro ( $10^{-6}$  litro)

μM - Micromolar ( $10^{-6}$  Molar)

μg – Micrograma ( $10^{-6}$  grama)



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

**FIGURA 1** - Eletroforese em gel de poliacrilamida do genoma de rotavírus e as proteínas codificadas por cada segmento genômico. Partícula de rotavírus e sua estrutura determinada por eletromicroscopia associada ao processamento de imagem por computador.....7

**QUADRO 1.** Funções atribuídas às proteínas codificadas pelos segmentos genômicos de *Rotavirus*.....8

**FIGURA 2.** Modelo hipotético para entrada de rotavírus no interior de células alvo, por meio de uma endocitose cálcio-dependente.....11

**FIGURA 3.** Representação esquemática do padrão de migração, em Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, do RNAfd relativo aos eletroferogrupos A, B, C, D e E de *Rotavirus*.....13

### ARTIGO

**TABELA 1.** Frequência de diagnóstico do rotavírus grupo A, realizado por ensaio imunoenzimático e eletroforese em gel de poliacrilamida, em seres humanos com diarreia aguda, distribuída de acordo com a faixa etária. Estado do Paraná, Brasil, 2000-2003.....30

**FIGURA 1.** Distribuição da frequência de casos de diarreia aguda (n=550) em seres humanos e de diagnóstico de rotavírus grupo A (n=120), de acordo com fatores climáticos. Estado do Paraná, Brasil, 2000-2003. Painel A: Média da umidade relativa do ar (%); Painel B: Média da temperatura mínima (°C); Painel C: Média do índice pluviométrico (mm<sup>3</sup>). Dados do Serviço de Informação Meteorológica do Estado do Paraná (SIMEPAR).....31

**TABELA 2.** Genotipos G (VP7) e P (VP4) de rotavírus grupo A, identificados por multiplex-nested-PCR, em amostras de fezes (n=114) de crianças e adultos com diarreia aguda. Estado do Paraná, Brasil, 2000-2003.....32

### APÊNDICES

#### Documentação Fotográfica

**FOTO 1.** Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata, do RNAfd dos rotavírus grupo A humano provenientes de amostras fecais humanas encaminhadas ao LACEN-PR, no período de 2000 a 2003.....81

**FOTO 2.** Detalhe dos segmentos genômicos de RNAfd de rotavírus grupo A humano, de três amostras fecais, analisadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata.....81

**FOTO 3.** Análise por eletroforese em gel de agarose 2,5 % com brometo de etídeo, dos produtos amplificados pela RT-PCR e N-PCR, de rotavírus grupo A humano provenientes de amostras fecais, para determinação dos genótipos P.....**82**

**FOTO 4.** Análise por eletroforese em gel de agarose 2,5 % com brometo de etídeo, dos produtos amplificados pela RT-PCR e N-PCR, de rotavírus grupo A humano, provenientes de amostras fecais, para determinação dos genótipos G.....**83**

#### Tabelas e Gráficos

**TABELA 3.** Distribuição dos casos positivos e negativos para RV gp A por EIARA, Estado do Paraná, 2000-2003.....**85**

**TABELA 4.** Resultado da Genotipagem de RV gp A, por *Multiplex Nested* - PCR, e os grupos etários de ocorrência, Estado do Paraná, 2000-2003.....**86**

**GRÁFICO 1.** Resultado do diagnóstico para RV gp A por EIARA, Estado do Paraná, 2000 – 2003.....**87**

**GRÁFICO 2.** Distribuição, de acordo com o grupo etário, dos casos positivos de RV gp A por EIARA, Estado do Paraná, 2000 – 2003.....**87**

**GRÁFICO 3.** Genótipos G identificados em infecções singulares por RV gp A, Estado do Paraná, 2000 – 2003.....**87**

**GRÁFICO 4.** Genótipos P identificados em amostras RV gp A positivas, Estado do Paraná, 2000 – 2003.....**88**

**GRÁFICO 5.** Resultado da genotipagem de RV gp A, Estado do Paraná, 2000 – 2003.....**88**

**SANTOS, J. S. EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO DOS GENOTIPOS P (VP4) E G (VP7) DE *ROTAVIRUS* GRUPO A HUMANO NO ESTADO DO PARANÁ, 2000-2003. Curitiba-PR, 2005. 93p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia – área de concentração: Microbiologia) Universidade Federal do Paraná.**

## **RESUMO**

Os rotavírus grupo A são os principais agentes etiológicos de gastroenterite viral aguda em crianças e constituem uma importante causa de mortalidade infantil nos países em desenvolvimento. O prévio conhecimento dos aspectos epidemiológicos da infecção e das características antigênicas e moleculares dos rotavírus constitui-se em informação indispensável para o sucesso de condutas de controle e profilaxia dessa virose. O presente trabalho, de caráter retrospectivo, teve por objetivos avaliar dados epidemiológicos da rotavirose e caracterizar os genótipos G (VP7) e P (VP4) das amostras de rotavírus grupo A humano, identificadas em casos de diarreia aguda no Estado do Paraná. No período de janeiro de 2000 a dezembro de 2003, 550 amostras de fezes de crianças e adultos, com quadro clínico de diarreia aguda, foram encaminhadas para o diagnóstico de rotavírus grupo A. Por meio de ensaio imunoenzimático, 120 (21,8%) amostras foram positivas. Dessas, 114 amostras foram genotipadas por meio da multiplex-*nested*-PCR. A maior frequência (77,5%) de amostras positivas (n=93) foi observada em crianças menores de cinco anos de idade. Nos meses frios e secos dos quatro anos avaliados observou-se a maior concentração de casos positivos para o rotavírus. Os genótipos de maior ocorrência foram: G1 (50,9%), G4 (9,6%), G9 (7,0%), G2 (1,7%), G3 (0,9%), P[8] (71,9%), P[4] (3,5%). As associações de genótipos P e G mais encontradas foram: P[8],G1 (46,5%) e P[8],G4 (9,6%). Infecções mistas, caracterizadas por estirpes de rotavírus com mais de um genótipo G, P e estirpes não-tipadas foram observadas, respectivamente, em 8,8%, 3,5% e em 16,7% das amostras. De forma semelhante ao que vem ocorrendo em várias partes do mundo, a identificação do genótipo G9 em amostras de rotavírus obtidas, ao longo dos quatro anos do estudo, ratifica a emergência desse genótipo também no Estado do Paraná.

**Palavras-chaves:** diarreia, rotavírus, diagnóstico, EGPA, genótipos, RT-PCR

**SANTOS, J. S. EPIDEMIOLOGY AND P (VP4) AND G (VP7) GENOTYPES CHARACTERIZATION OF HUMAN GROUP A *ROTAVIRUS* IN PARANÁ STATE, BRAZIL, 2000-2003. Curitiba-PR, 2005. 93p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia – área de concentração: Microbiologia) Universidade Federal do Paraná.**

### **ABSTRACT**

Group A rotaviruses are the major etiological agents of viral acute gastroenteritis of infants and young children and constitutes an important cause of infantile mortality in developing countries. The previous knowledge of the epidemiologic aspects of the infection and the antigenic and molecular characteristics of rotavirus constitutes indispensable information for the success of behaviours of control and prophylaxis of this disease. The present work, of retrospective nature, had for objectives to evaluate epidemiological data of disease caused by rotavirus and to characterize the G (VP7) and P (VP4) genotypes of the human group A rotaviruses samples, identified in cases of acute diarrhea in Paraná State, Brazil. In the period of January/2000 to December/2003, 550 fecal samples from children and adults, with acute diarrhea, were sent for the diagnosis of group A rotavirus. By enzyme immunoassay 120 samples (21.8%) were positive to group A rotaviruses. These, 114 samples were genotyped by multiplex-nested-PCR. The higher frequency (77.5%) of positive samples (n=93) was observed in children under 5 years old. In the cold and dry seasons of the four evaluated years was observed the greatest rate of rotavirus positive cases. The genotypes of major occurrence were: G1 (50.9%), G4 (9.6%), G9 (7.0%), G2 (1.7%), G3 (0.9%), P[8] (71.9%), P[4] (3.5%). The main combinations found to P and G genotypes were: P[8],G1 (46.5%) and P[8],G4 (9.6%). Mixed infections, characterized by rotaviruses with more than one G, and/or P genotypes, and nontypeable rotavirus were observed, respectively, in 8.8%, 3.5% and 16.7% of samples. The identification of G9 genotype in rotavirus samples evaluated along four years of studies ratifies the emergency of this genotype also in Paraná State, as worldwide.

**Key words:** diarrhea, rotavirus, diagnostic, PAGE, genotypes, RT-PCR

## 1 INTRODUÇÃO

A diarreia é uma importante causa de morbidade em humanos em todo o mundo, afetando principalmente crianças. Os rotavírus do grupo A (RV gp A) são os agentes mais comuns de gastroenterite aguda em crianças, causando grande número de hospitalizações. Em todo o mundo, anualmente ocorrem cerca de 138 milhões de casos de diarreia induzidos por RV (PARASHAR et al., 2003).

Os RV foram detectados pela primeira vez no Brasil em 1976 (LINHARES et al., 1977). Desde então, vários trabalhos têm demonstrado a relevância desse vírus na etiologia da diarreia viral por todo o país.

Devido aos RV infectarem, possivelmente, todas as crianças até os cinco anos de idade, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, é improvável que somente cuidados com água, alimentos e condições sanitárias adequadas sejam capazes de reduzir a incidência dessa infecção. Este impacto, por todo o mundo, tem resultado em vários estudos para o desenvolvimento de estratégias vacinais que sejam capazes de reduzir tanto a morbidade quanto a mortalidade causadas pelos RV. O conhecimento das freqüências e distribuição dos sorotipos/genotipos dos RV pode ajudar na análise das diferenças regionais e variações que ocorrem nas populações no decorrer dos anos, servindo como base para o uso de estratégias de prevenção adequadas (PARASHAR et al., 1998).

As proteínas VP4 (P tipo) e VP7 (G tipo), presentes na camada externa dos RV, codificadas por segmentos genômicos específicos, promovem respostas de anticorpos neutralizantes, formando a base para a classificação atual dos RV gp A, em P e G tipos. Sorotipagem, genotipagem e/ou seqüenciamento do ácido nucleico, têm sido amplamente utilizados para definição dos tipos G, e todos os sorotipos G são confirmados como genotipos. Em contraste, nem todos os sorotipos P são confirmados como genotipos, sendo assim, os métodos de biologia molecular como a reação em cadeia pela polimerase, precedida por transcrição reversa (RT-PCR) são utilizados atualmente para definir os genotipos P e G de RV (ESTES, 1996).

Este estudo tem por objetivo a definição de aspectos da epidemiologia clássica e molecular da rotavirose no Estado do Paraná, no período de Janeiro de 2000 a Dezembro de 2003, utilizando a técnica da RT-PCR para a definição dos genotipos P e G presentes em amostras positivas para RV, armazenadas no

Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR). Os resultados dessa investigação devem contribuir para o conhecimento e monitoramento da diversidade genotípica e da distribuição dos RV no Estado do Paraná, fornecendo informações importantes que poderão ser utilizadas quando da definição de estratégias de prevenção dessa importante virose infantil.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo geral**

- Avaliar parâmetros epidemiológicos da rotavirose em seres humanos e caracterizar os genótipos G (VP7) e P (VP4) de rotavírus grupo A identificados em uma coleção de amostras fecais diarréicas, provenientes de distintas regiões geográficas do Estado do Paraná no período de 2000 a 2003.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Determinar a frequência de ocorrência de rotavírus grupo A em uma coleção de amostras fecais diarréicas, disponibilizada pelo LACEN-PR;
- Avaliar a faixa etária de maior ocorrência, distribuição mensal dos diagnósticos e as características climáticas dos períodos de ocorrência de diarreia por rotavírus grupo A em humanos no Estado do Paraná;
- Caracterizar os genótipos G (VP7) e P (VP4) dos rotavírus grupo A identificados;
- Identificar as associações mais frequentes dos genótipos G e P;
- Avaliar as taxas de infecções singulares, mistas e heterólogas, bem como identificar genótipos incomuns.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA DAS DIARRÉIAS INFANTIS

As infecções entéricas que causam diarreia em crianças são um dos maiores problemas de saúde enfrentados pelos países em desenvolvimento. Os episódios de diarreia em crianças podem ocasionar atraso no crescimento, além de serem as razões mais freqüentes para a procura de serviços de saúde pública e uma das principais causas de mortalidade infantil (MARTINES; PHILLIPS; FEACHEM, 1991).

Até os cinco anos de vida toda criança, possivelmente, pode apresentar vários episódios de diarreia, com intensidade variável e potencial para o desenvolvimento de grave desidratação, distúrbios nutricionais e, eventualmente, morte (BERN ; GLASS, 1994). Nos países em desenvolvimento, as diarreias são responsáveis por 25 a 30% das mortes registradas em crianças menores de cinco anos, representando 2,5 milhões de óbitos por ano (KOSEK; BERN; GUERRANT, 2003).

Nos países desenvolvidos essa enfermidade é considerada um problema de saúde pública com considerável morbidade entre crianças e idosos. As intervenções necessárias ao tratamento e controle das diarreias nesses países acarretam grande aumento nos custos, diretos e indiretos, dos sistemas de saúde (MARTINES; PHILLIPS; FEACHEM, 1991; KOSEK; BERN; GUERRANT, 2003).

A etiologia das diarreias é bastante complexa e pode envolver diferentes agentes como vírus, bactérias, parasitas e também toxinas. A importância relativa dos agentes etiológicos é variável, e o predomínio de um agente ou sua distribuição sazonal está diretamente relacionado com a freqüência e intensidade com que medidas higiênico-sanitárias são adotadas. Estudos indicam que, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, um grande número de casos de diarreia tem sido atribuído à etiologia viral (BERN; GLASS, 1994; CICIRELLO; GLASS, 1994).

Os vírus são reconhecidos como importantes causadores de gastroenterites, principalmente em crianças. Nos países desenvolvidos, estima-se que cerca de 70-80% das gastroenterites em crianças sejam de etiologia viral (ARANDA-MICHEL;



GIANELLA, 1999). *Torovirus*, coronavírus entérico, *Picobirnavirus* e *Pestivirus* têm sido cada vez mais identificados como agentes causadores de diarreias. Norwalk virus, Sapporo virus, *Astrovirus*, adenovírus entérico e, principalmente, *Rotavírus A* são os mais importantes agentes das diarreias de etiologia viral (WILHELM; ROMAN; SANCHEZ-FANQUIER, 2003).

## **2.2 ROTAVÍRUS**

### **2.2.1 Histórico**

Os RV humanos foram descritos pela primeira vez em 1973, na Austrália, por Bishop e colaboradores, pela identificação de partículas virais em cortes histológicos de mucosa duodenal de crianças com diarreia aguda, por meio de microscopia eletrônica. No ano seguinte, vírus com características semelhantes foram detectados em amostras fecais de crianças com gastroenterite aguda (BISHOP et al., 1974). Inicialmente, esses vírus foram denominados orbivírus e reovírus-like, por apresentarem semelhança morfológica aos membros da família *Reoviridae* (FLEWETT; BRYDEN; DAVIES, 1973). Flewett e colaboradores, em 1974, sugeriram a denominação rotavírus, em decorrência da semelhança morfológica desses vírus a uma roda (em latim "*rota*") quando observados ao microscópio eletrônico.

No Brasil, a primeira descrição de RV em humanos ocorreu em 1976, a partir de material fecal proveniente de crianças admitidas em um hospital público de Belém, PA (LINHARES et al., 1977). Desde então, foram realizadas inúmeras investigações em crianças no país, demonstrando a ocorrência de surtos de diarreia associados ao RV (RACZ et al., 1988; CARDOSO et al., 1992; PEREIRA et al., 1993; MASCARENHAS et al., 1999; CARDOSO et al., 2003).

A primeira descrição da presença de RV em animais foi em 1969, por Mebus e colaboradores, que demonstraram a presença de partículas virais em amostras de fezes de bovinos com diarreia. Woode, Jones e Bridger, em 1975, realizaram o primeiro relato de RV em fezes de suínos com diarreia. Desde então, inúmeros trabalhos têm sido publicados relacionando os RV a gastroenterites em diversas espécies de mamíferos e de aves.

## 2.2.2 Morfologia dos Rotavírus

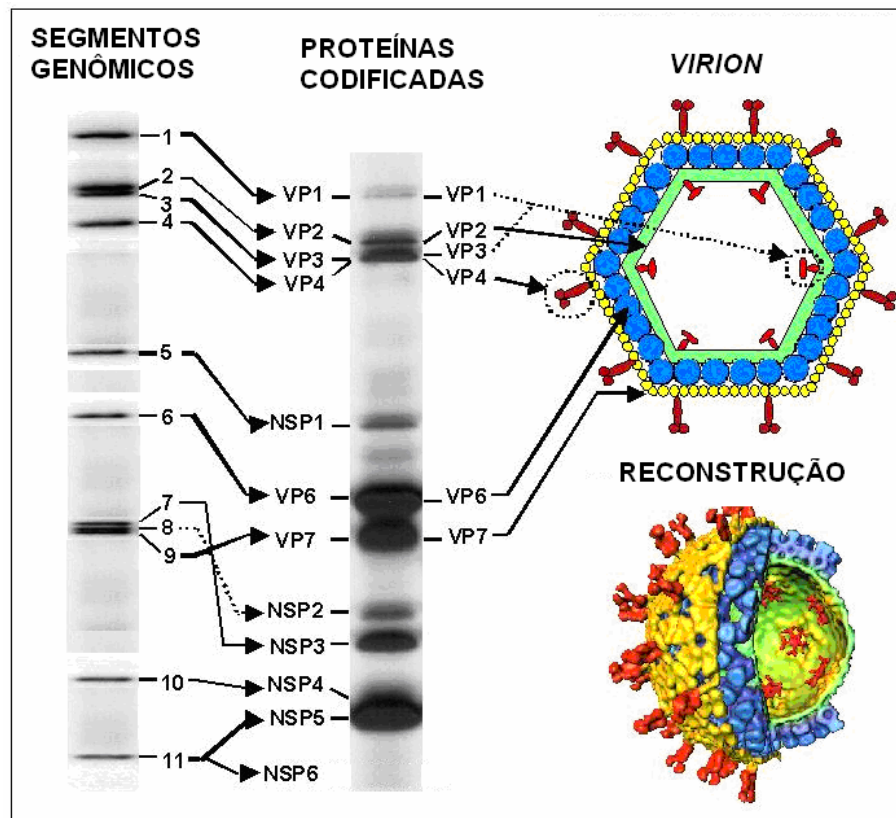
Os RV são partículas de simetria icosaédrica, não envelopados, medindo aproximadamente 100 nm de diâmetro (PESAVENTO; ESTES; PRASAD, 2003). Apresentam capsídeo triplo formado por três camadas proteicas concêntricas, que foram designadas como capsídeo externo, intermediário e interno (*core*) que circunda o genoma viral (PRASAD; CHIU, 1994). O material genético dos RV é constituído por ácido ribonucléico de fita dupla (RNAfd), com 11 segmentos, que codificam seis polipeptídeos estruturais e cinco não-estruturais (DESSELBERGER, 1989). Cada um dos segmentos codifica uma proteína específica. Estudos com a estirpe sítima SA11 de RV, identificaram uma sexta proteína não-estrutural, codificada pelo segmento 11 do genoma viral, sendo esse o único segmento de RV que codificaria mais de uma proteína (MATTION et al., 1991). A figura 1 (p.7) apresenta os segmentos genômicos de RV e as proteínas codificadas por cada segmento. As partículas de RV apresentam atividade de RNA polimerase RNA-dependente e todas as demais propriedades enzimáticas necessárias para a replicação viral (ESTES, 2001).

As partículas virais purificadas possuem gradientes de sedimentação distintos, com densidades de 1,44 g/cm<sup>3</sup> para partículas com capsídeo simples, 1,38 g/cm<sup>3</sup> para partículas com capsídeo duplo e 1,36 g/cm<sup>3</sup> para partículas com capsídeo triplo (BICAN et al., 1982).

As proteínas estruturais são designadas VP (*Viral Protein*) seguidas por número seqüencial na ordem decrescente da massa molecular. No *core* estão presentes as proteínas VP1 (125KDa), VP2 (94KDa) e VP3 (88KDa); no capsídeo intermediário a VP6 (46KDa), e no capsídeo externo as proteínas VP4 (88KDa) e VP7 (38KDa) (ESTES; COHEN, 1989). As proteínas não-estruturais, encontradas nas partículas virais maduras, recebem a denominação NSP (*Non-Structural Protein*).

No *core* viral, as proteínas VP1 (*Pol*) e VP3 (*Cap*) estão diretamente associadas ao genoma. A proteína VP2 constitui a capa, sendo a mais abundante do *core* viral com 120 moléculas por *virion*. A proteína VP1 possui atividade de RNA polimerase RNA-dependente e a proteína VP3 tem atividade de guanililtransferase, estando envolvida na adição da estrutura 5'-*cap* presente nos RNAs mensageiros. O

capsídeo intermediário é formado por 780 moléculas da proteína estrutural VP6, organizadas em 260 unidades triméricas. O capsídeo externo é composto por duas proteínas, VP4 e VP7, que são responsáveis pelas interações iniciais do vírus com a célula hospedeira. A superfície externa do vírus apresenta 780 cópias da glicoproteína VP7, em arranjos trímeros e 120 cópias da proteína VP4, que formam 60 estruturas diméricas semelhantes a espículas. A proteína VP4 contém um sítio de clivagem pela tripsina e quando submetida ao tratamento com protease *in vitro* produz dois produtos, as proteínas VP5 e VP8, aumentando a infectividade do vírus. O quadro 1 (p. 8) sintetiza as possíveis atividades de cada uma das proteínas dos RV (ESTES, 2001).



**FIGURA 1.** Eletroforese em gel de poliacrilamida do genoma de rotavírus, RNA fita dupla, segmentado (esquerda) e as proteínas codificadas por cada segmento genômico (centro). Partícula de rotavírus representada esquematicamente (direita acima); partícula de rotavírus e sua estrutura determinada por eletromicroscopia associada ao processamento de imagem por computador (direita abaixo).

FONTE: ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.) *Fields Virology*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott & Wilkins, 2001 (adaptado).

NOTA: Segmentos numerados baseados na migração do genoma de rotavírus grupo A da estirpe SA11.

**QUADRO 1 - FUNÇÕES ATRIBUÍDAS ÀS PROTEÍNAS CODIFICADAS PELOS SEGMENTOS GENÔMICOS DE ROTAVIRUS**

Gene <sup>(1)</sup>	Tamanho(pb)	Proteína	Massa Molec.(Da)	Localização nas partículas	n. de cópias	Funções
1	3.302	VP1	125.005	nucleocapsídeo	12	RNA polimerase dependente de RNA
2	2.690	VP2	102.431	nucleocapsídeo	120	União ao RNA/ Formação do nucleocapsídeo
3	2.591	VP3	98.120	nucleocapsídeo	12	Guanililtransferase/Metiltransferase/Proteína Básica
4	2.362	VP4	86.782	capsídeo externo	120	Proteína de união à célula/Interage com VP6 Infectividade viral aumenta após clivagem pela tripsina formando VP5 e VP8  VP5 permeabiliza membranas
		VP5 <sup>(2)</sup>	60.000	produto da clivagem de VP4		
		VP8 <sup>(2)</sup>	28.000	produto da clivagem de VP4		
5	1.611	NSP1	58.654	prot. não estrutural	0	Associa-se com citoesqueleto/Interage com fator 3 regulatório de IFN
6	1.356	VP6	48.16	capsídeo intermediário	780	Proteína estrutural do capsídeo intermediário/Antígeno de subgrupo
7	1.105	NSP3	34.600	prot. não estrutural	0	Envolvida na regulação da tradução
8	1.059	NSP2	36.700	prot. não estrutural	0	Acumula-se em viroplasmas/Atividade NTPase/Liga NSP5 e VP1
9	1.062	VP7	7.368	capsídeo externo	780	Glicoproteína estrutural do capsídeo externo / Antígenos neutralizantes G-tipo
10	751	NSP4	20.290	prot. não estrutural	0	Enterotoxina/ receptor para partícula com duplo capsídeo no RE
11	667	NSP5	21.725	prot. não estrutural	0	Possível cinase autocatalítica/Interage com VP2, NSP2 e NSP6
		NSP6	11.012	prot. não estrutural	0	Produto de ORF2 do gene 11/Interage com NSP5/Localizada em viroplasmas

**FONTE:** ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.) *Fields Virology*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott & Wilkins, 2001 (adaptação).

NOTA: Outras espécies dentro do gênero, podem ter proteínas com diferenças significativas de tamanho..

(1) Segmentos numerados baseados na migração do genoma da estirpe SA11 em gel de poliácridamida.

(2) Produtos da clivagem de VP4.

Embora os produtos de todos os genes dos RV sejam reconhecidos como antígenos pelo sistema imune, as proteínas VP4, VP6 e VP7 constituem os principais sítios antigênicos, induzindo a produção de anticorpos (KAPIKIAN, 1994).

Na arquitetura dos RV, três tipos de canais podem ser distinguidos com base em sua posição e tamanho, sendo 12 canais tipo I, 60 canais tipo II e 60 canais tipo III. Estes canais estão envolvidos na importação de metabólitos requeridos para a transcrição do RNA e para a exportação do transcrito nascente de RNA para subseqüente processo de replicação viral (PESAVENTO; ESTES; PRASAD, 2003).

### 2.2.3 Estrutura genômica

O genoma segmentado completo dos RV apresenta 18.550 pares de base (pb), com os tamanhos dos segmentos variando entre 663 e 3.302 pb. Cada segmento de RNA, no sentido 5', inicia com uma guanidina, seguido de um conjunto de seqüências conservadas que são parte da região não-codificadora 5'. Segue uma região aberta de leitura (ORF, *Open Reading Frame*), que codifica para uma proteína, que termina com o códon de terminação, seguida por um conjunto de seqüências não-codificadoras, que contém um subconjunto de seqüências conservadas que terminam com duas citidinas na extremidade 3' (ESTES, 2001).

Quase todos os RNAs mensageiros terminam com uma seqüência consenso 5'-UGUGACC-3', sendo que estas seqüências contêm sinais importantes para a expressão gênica e replicação (WENTZ; PATTON; RAMIG, 1996). Os tamanhos das regiões não-codificadoras, nas extremidades 5' e 3', são variáveis para os diferentes genes e todos os genes seqüenciados possuem pelo menos uma ORF longa depois do primeiro códon de iniciação (ESTES, 2001). A grande conservação das seqüências terminais nos segmentos genômicos sugere que elas contêm importantes sinais para a transcrição, transporte de RNA, replicação, montagem ou empacotamento dos segmentos genômicos (PATTON; SPENCER, 2000).

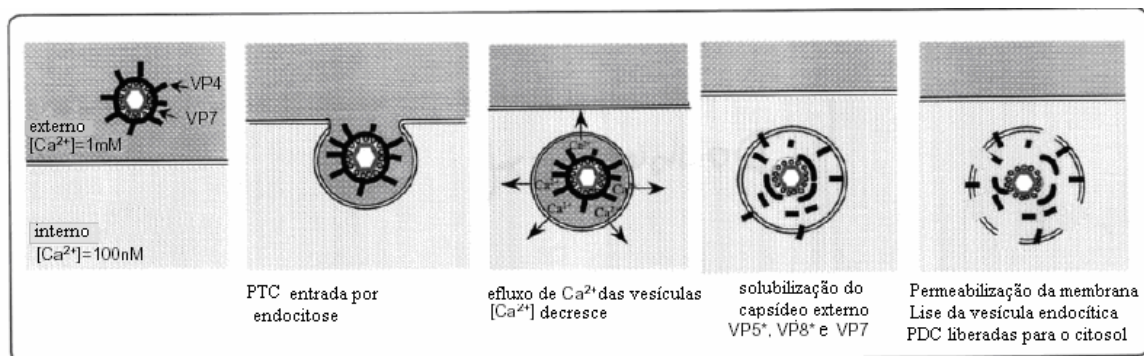
Os RV são os únicos agentes infecciosos conhecidos de mamíferos e aves que apresentam 11 segmentos de RNA fita dupla (RNAfd). O RNA genômico pode ser extraído de partículas virais semi-purificadas e separado de acordo com as massas moleculares e a velocidade de migração, utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), apresentando um padrão eletroforético, ou eletroferotipo, típico para esses vírus (PEREIRA et al., 1983).

### 2.2.4 Ciclo de Replicação

Somente partículas com triplo capsídeo conseguem aderir-se às células. A proteína VP4 tem função essencial no ciclo de replicação do vírus, incluindo a ligação ao receptor e a penetração celular. O papel da VP7 durante a interação inicial não é bem estabelecido (ZARATE et al., 2004). As moléculas implicadas como receptores para o RV incluem gangliosídeos GM1 e GM3, integrinas  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha \beta 2$  e  $\alpha \beta 3$  e a proteína de choque térmico hsc 70 (ARIAS et al., 2001). Resíduos de ácido siálico podem participar, direta ou indiretamente, do processo de interação do RV com a célula, porém estudos demonstram que a maioria dos RV inicia a infecção por um mecanismo ácido siálico-independente (KELJO; SMITH, 1988; FUKUDOME; YOSHIE; KONNO, 1989).

O ciclo de replicação e a estrutura dos RV são extremamente dependentes da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio (RUIZ; COHEN; MICHELANGELI, 2000). Após a ligação o vírus é internalizado. A internalização não ocorre entre 0°C e 4°C, indicando que esse passo requer processo celular ativo (KELJO; SMITH, 1988). O mecanismo de entrada do RV na célula ainda não está bem esclarecido, mas pode se dar, segundo estudos, por entrada direta com tripsinização de VP4 (KALJOT et al., 1988) ou por endocitose sem acidificação do endossoma (RUIZ et al., 1997). Esse processo de endocitose é cálcio-dependente, sendo que a ligação do RV ao receptor celular induz a formação de uma vesícula endocítica, isolando a partícula com capsídeo triplo em um compartimento intracelular. Ocorre redução da concentração de cálcio na vesícula, por meio de difusão simples, sendo que, uma vez a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  estando equilibrada com o citoplasma, o vírus perde o capsídeo externo e ocorre lise vesicular, permitindo que partículas com duplo capsídeo passem para o citoplasma, sendo essas ativas para os processos de transcrição (RUIZ; COHEN; MICHELANGELI, 2000) (figura 2, p.11).

A transcrição dos RV e todas as demais atividades inerentes à replicação do genoma e montagem dos *virions* são realizadas por enzimas virais (IMAI et al., 1983). É proposto que o processo de replicação do genoma dos RV e a formação do *core* viral e das partículas com duplo capsídeo, ocorram em viroplasmas (ALTENBURG; GRAHAM; ESTES, 1980; GONZALES et al., 2000). O RNA transcrito atua diretamente na síntese das proteínas estruturais e não-estruturais dos RV e também serve como molde do RNA para a síntese da fita negativa do material genético, para formar o genoma segmentado do RNAfd .



**FIGURA 2.** Modelo hipotético para entrada de rotavírus no interior de células alvo, por meio de uma endocitose cálcio-dependente.

FONTE: RUIZ, M. C.; COHEN, J.; MICHELANGELI, F. Role of Ca<sup>++</sup> in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium*. v.28, n.3, p:137-149, 2000 (adaptado).

NOTA: PTC= Partículas com Triplo Capsídeo; PDC= Partículas com Duplo Capsídeo

A morfogênese viral é um processo complexo que envolve a participação de proteínas estruturais e não-estruturais além da formação de pelo menos três estágios de replicação intermediária, que são precursores das partículas com duplo capsídeo (GALLEGOS; PATTON, 1989). A maioria das proteínas virais é sintetizada nos viroplasmas, e a formação dos novos *virions* envolve uma dinâmica participação das proteínas virais do citoplasma e dos viroplasmas. É altamente coordenada a formação do *core* com uma cópia de cada um dos 11 segmentos do genoma dos RV (PATTON; SPENCER, 2000). Uma vez que as partículas com duplo capsídeo estão formadas, elas passam dos viroplasmas para o interior do retículo endoplasmático adjacente. Durante este processo, que é mediado pela interação das partículas de duplo capsídeo com a proteína viral NSP4, que está na forma de transmembrana no retículo endoplasmático, estas partículas adquirem uma temporária bicamada lipídica. Estas partículas, provisoriamente envelopadas, contêm as proteínas de superfície, VP4 e VP7, bem como pequenas quantidades de outras proteínas não-estruturais (PORUCHYNSKY; MAASS; ATKINSON, 1991). O envelope lipídico é removido por mecanismos desconhecidos, levando a formação dos *virions* maduros.

Estudos de microscopia eletrônica têm demonstrado que ao final do ciclo infeccioso a progênie é liberada por lise das células hospedeiras (McNULTY; CURRAN; McFERRAN, 1976; ALTENBURG; GRAHAM; ESTES, 1980). Extensiva citólise ocorre no término da infecção e drásticas alterações na permeabilidade da membrana plasmática em células infectadas resultam na liberação de proteínas celular e viral. Apesar da lise celular, muitas partículas, com duplo ou triplo capsídeo, permanecem associadas com o resto celular, sugerindo interações com estruturas no interior da

célula. Interações com a membrana celular e com o citoesqueleto têm sido sugeridas (MUSALEM; ESPEJO, 1985).

### 2.2.5 Sorogrupos e Subgrupos

A proteína VP6, que constitui o capsídeo intermediário, é a proteína mais abundante do *virion*, sendo utilizada como principal antígeno na detecção dos RV. De acordo com diferenças antigênicas encontradas em VP6, podem-se classificar os RV em sete sorogrupos distintos. Os membros de cada um dos sorogrupos A, B, C, D, E, F ou G, apresentam um antígeno comum e um padrão distinto de migração eletroforética dos 11 segmentos do RNAfd (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001).

Dos sete sorogrupos dos RV somente os grupos (gp) A, B e C determinam infecções, que por sua frequência, podem ser consideradas de importância epidemiológica para humanos e animais (SAIF, 1990).

O RV gp A é o principal causador de diarreia infantil humana grave e em muitas espécies animais em todo o mundo, e está associada com, aproximadamente, mais de 500 mil mortes anuais de crianças menores de cinco anos (PARASCHAR et al., 2003). RV gp B e C têm sido associados com diarreia em humanos em diferentes regiões do mundo (SAIF; JIANG, 1994; TEIXEIRA et al., 1998).

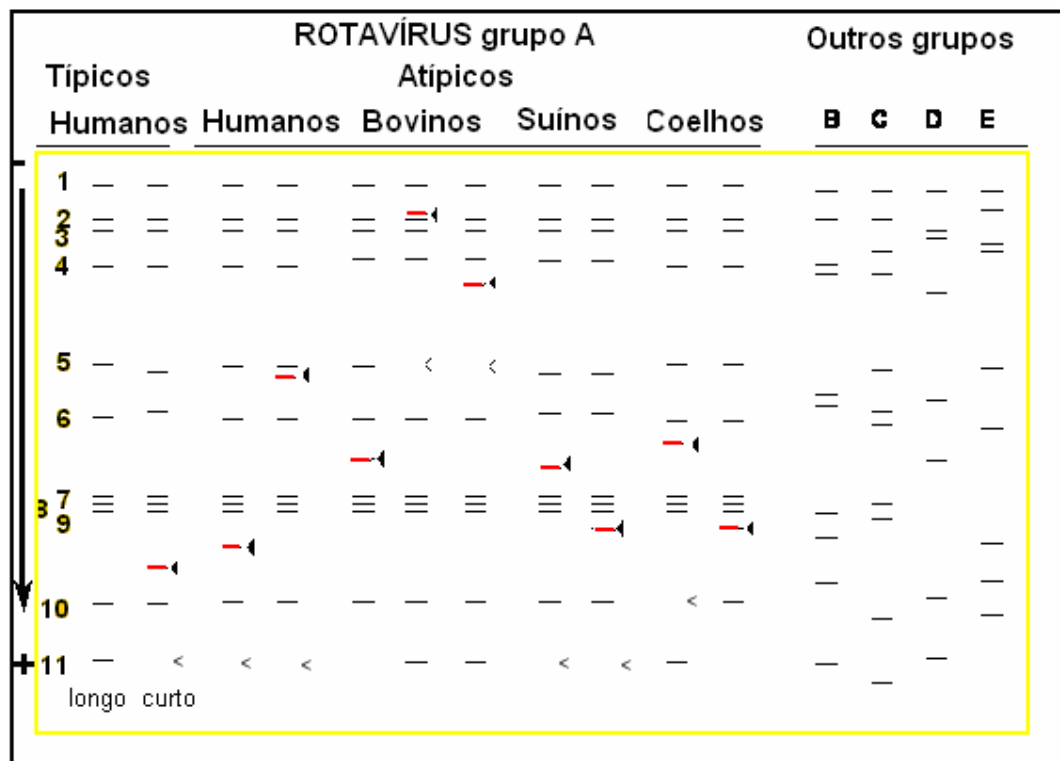
Estudos epidemiológicos demonstram que, em termos de rotavirose, excetuando-se o RV gp A, as infecções por RV gp C são mais frequentes, tanto no homem quanto em animais (SAIF, 1990; TSUNEMITSU et al., 1991).

Adicionalmente aos antígenos de grupo, antígenos de subgrupos também estão localizados na proteína VP6. Quatro diferentes especificidades para subgrupo podem ser identificadas nas estirpes de RV gp A, como subgrupo I, II, I e II e subgrupo não-I e não-II (BACHMANN et al., 1984). A especificidade de subgrupos é descrita também em VP2 (KAPIKIAN; CHANOCK, 1990).

O padrão genômico dos RV, identificados por meio da EGPA (figura 3, p. 13), consiste de classes e/ou regiões de diferentes massas moleculares, contendo os segmentos do RNAfd. Para RV gp A o padrão apresentado é: Classe I (segmentos 1 a 4), Classe II (segmentos 5 e 6), Classe III (segmentos 7, 8 e 9) e Classe IV (segmentos 10 e 11). Importante característica para o RV gp A é a migração dos segmentos 7, 8 e 9 em forma de trinca, devido as suas massas moleculares serem bastante próximas, o que não ocorre nos demais grupos (B a G). O perfil eletroforético, não deve ser o único método utilizado para a classificação dos RV, pois as alterações no genoma viral, por



mutação pontual, *reassortment* ou rearranjo, podem levar a alterações no padrão de migração dos segmentos (SAIF; JIANG, 1994).



**FIGURA 3.** Representação esquemática do padrão de migração, em Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, do RNAdf relativo aos eletroferogrupos A, B, C, D e E de *Rotavirus*.

FORTE: ALFIERI, A.A. *Padronização de Métodos para caracterização genotípica de Rotavirus grupos A e C de origem humana e animal*. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1996, 352p. Tese de Doutorado. Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

### 2.2.6 Sorotipos e Genotipos

Devido à capacidade de indução de anticorpos neutralizantes e de segregação durante a replicação viral, as proteínas do capsídeo externo VP4 e VP7, ou os segmentos genômicos que as codificam, caracterizam as estirpes de RV em sorotipos e/ou genotipos (KAPIKIAN; CHANOCK, 1990).

São descritos atualmente, por meio de técnicas sorológicas e/ou moleculares, 14 sorotipos e 15 genotipos G de RV gp A, denominados de G1 a G15, determinados pela análise da seqüência de nucleotídeos do gene correspondente à glicoproteína VP7 (HOSHINO; KAPIKIAN, 2000). A definição de sorotipos P não é bem determinada, existindo 11 sorotipos tentativamente designados, com subtipos reconhecidos para quatro deles, mas que não possuem correlação com os genotipos P (KAPIKIAN;

HOSHINO; CHANOCK, 2001). O estudo do gene que codifica a proteína VP4, pelo seqüenciamento de nucleotídeos, estabelece 21 genótipos P de RV de humanos e animais, designados de P[1] a P[21]. A utilização de métodos sorológicos para a identificação dos sorótipos P e G de RV apresenta várias limitações como: i) alta taxa de amostras não-sorotipadas nos levantamentos epidemiológicos; ii) grande número de infecções mistas ou variantes antigênicas; iii) não caracterização de sorótipos P por meio de ensaios imunoenzimáticos comerciais (ALFIERI, 1999).

Com as técnicas moleculares como a hibridização de ácidos nucleicos e a reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR), a genotipagem passou a ser adotada como melhor opção para a caracterização dos RV devido à boa correlação com a especificidade antigênica, ao uso de reagentes sintéticos universais e a possibilidade da análise de um maior número de amostras (GENTSCH et al., 1996).

Dentre as inúmeras combinações possíveis entre os diferentes genótipos P e G, algumas são mais freqüentes, inclusive apresentando diferenças entre genótipos mais comuns, de acordo com a espécie hospedeira, demonstrando predomínio na freqüência de algumas associações entre os genótipos P e G. Estudos indicam que quatro P-G combinações, P[8],G1, P[4],G2, P[8],G3 e P[8],G4 são amplamente comuns em todo o mundo, em freqüências variáveis, além dos genótipos emergentes P[8],G9 e P[6],G9 (SANTOS; HOSHINO, 2005).

### **2.2.7 Transmissão e Patogenia das Rotaviroses**

A infecção pelo RV acomete principalmente crianças menores de cinco anos, indivíduos imunodeprimidos e pessoas idosas. Crianças maiores de cinco anos e adultos, geralmente, apresentam infecção assintomática decorrente do contato com uma pessoa infectada no ambiente familiar ou institucional (BLACKLOW; GREENBERG, 1991). Entre neonatos, as infecções parecem ser geralmente assintomáticas, possivelmente devido à transferência passiva de anticorpos maternos, à ocorrência de estirpes virais atenuadas no ambiente da maternidade hospitalar ou pela imaturidade intestinal do neonato (HAFFEJEE, 1991).

A infecção ocorre principalmente pela via oral por meio da ingestão de água e alimentos contaminados com fezes (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001). Vários autores comentam a possível transmissão dos RV pela via respiratória (GORDON, 1982; COOK et al., 1990). Veiculação hídrica de partículas infecciosas de RV também

é relatada na literatura (CRAUN, 1981; KHAN; AHMED; KHALID, 1992). Alguns pesquisadores postulam o potencial zoonótico dos RV, tendo em vista as observações da ocorrência de estirpes de RV de animais que compartilham o mesmo antígeno neutralizante com estirpes provenientes de humanos e, da ocorrência de estirpes animais que naturalmente infectam seres humanos, ou que são capazes de formar recombinações genéticas com estirpes de RV de humanos (NAKAGOMI; NAKAGOMI, 1991).

As partículas infectantes de RV podem permanecer por longos períodos de tempo sobre superfícies (MOE; SHIRLEY, 1982). Vários estudos demonstram a influência da umidade relativa do ar na viabilidade das partículas virais (ADAMS; SPENDLOVE; BARNETT, 1982; SATTAR et al., 1984).

Os RV apresentam tropismo por enterócitos maduros das porções média e alta das vilosidades do intestino delgado de animais e de humanos, podendo causar quadros graves de gastroenterite (LUNDGREN; SVENSSON, 2001). Durante a multiplicação dos vírus nos enterócitos ocorrem morte e descamação dessas células, que são substituídas por células imaturas das criptas intestinais, as quais têm capacidade de absorção reduzida (PRASAD; ESTES 1997). Durante a diarreia ocorre diminuição da digestão de açúcares e da absorção de sais minerais e água, aumentando a gravidade da doença (KAPIKIAN; CHANOCK, 1996).

Outras lesões também têm sido relacionadas com a rotavirose, como a infiltração mononuclear da lâmina própria, distensão da cisterna do retículo endoplasmático, aumento mitocondrial e presença de microvilosidades esparsas e irregulares (BISHOP et al., 1973; MOON, 1994).

Estudos realizados em camundongos demonstraram a participação da proteína não-estrutural NSP4 dos RV, como uma enterotoxina, induzindo diarreia quando administrada pela via intraperitoneal ou intraluminal (BALL et al., 1996; ESTES; MORRIS, 1999). De acordo com Kapikian, Hoshino e Chanock (2001), a proteína NSP4 interage com um receptor celular do epitélio intestinal, ativando uma via sinalizadora transducional que aumenta os níveis de  $Ca^{2+}$ , que por sua vez, leva ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática ao cloro e da secreção de cloro, induzindo a diarreia. Outros pesquisadores mencionam a participação da proteína NSP4 na estimulação do sistema nervoso entérico, pela liberação de aminas/peptídeo por meio de células endócrinas das vilosidades intestinais, pelo efeito da NSP4 no  $Ca^{2+}$  intracelular (LUNDGREN; SVENSSON, 2001).

A doença ocasionada pelo RV é precedida por um período de incubação de 24 a 48 horas. Durante os episódios de diarreia, uma pessoa pode excretar aproximadamente um trilhão de partículas virais por mililitro de fezes, sendo que a dose infectante para uma criança pode ser de 10 partículas (WARD et al., 1986). O quadro clínico pode incluir vômitos, febre, diarreia aquosa, desidratação variando de leve a grave e dor abdominal. Vômito e febre geralmente perduram por dois ou três dias, enquanto a diarreia geralmente persiste por cinco a oito dias (LINHARES; BRESEE, 2000). Uma importância em saúde pública é o fato de que a diarreia ocasionada pelo RV tem sido associada com o desenvolvimento de intolerância à lactose, exacerbando a ocorrência da desnutrição entre crianças que vivem em regiões tropicais (BISHOP, 1993).

Segundo alguns pesquisadores, podem ocorrer outros sinais clínicos na rotavirose além dos gastrointestinais. Associações de RV com infecção do sistema nervoso central (SCHUMACHER; FORSTER, 1999; ITURRIZA-GÓMARA et al., 2002), com edema agudo hemorrágico infantil (LERNIA; LOMBARDI; SCOCCO, 2004) e diabetes autoimune (BLOMQVIST et al., 2002) têm sido reportadas e são necessárias mais investigações para corroborar esses estudos.

### **2.3 EPIDEMIOLOGIA GLOBAL DAS ROTAVIROSES**

Estudos estimam que em todo o mundo ocorram anualmente 138 milhões de casos de gastroenterites por RV, principalmente em crianças menores de cinco anos, com uma média de dois milhões de hospitalizações e mais de 500 mil óbitos, onde os países em desenvolvimento somam mais de 80% dos casos fatais. Nos países industrializados estima-se o total de 223 mil hospitalizações anuais, decorrentes da infecção pelos RV. Nos países em desenvolvimento, cerca de 1,9 milhão de hospitalizações/ano são requeridas devido às diarreias pelo RV (PARASHAR et al., 2003).

Nos Estados Unidos, aproximadamente 2,7 milhões de crianças menores de cinco anos de idade apresentam diarreias decorrentes da rotavirose, resultando em 50 mil hospitalizações, com uma estimativa de 274 milhões de dólares em gastos médicos e mais de um bilhão de dólares em custos sociais (PARASHAR et al., 1998).

A ocorrência de rotavirose em crianças com 4 a 36 meses de idade geralmente requer hospitalização. As infecções em adultos geralmente são subclínicas, podendo,

ocasionalmente, causarem doença em pessoas próximas a crianças com rotavirose, em pacientes imunocomprometidos, idosos e em viajantes (PARASHAR et al., 1998).

No Brasil, desde a primeira descrição realizada por Linhares e colaboradores em 1977, vários estudos passaram a determinar a presença de RV em várias regiões do país (TIMENETSKY; SANTOS; GOUVEA, 1994; LEITE et al., 1996; ALFIERI, 1999; MENEGHETTI et al., 2001; SILVA; NAVECA; CARVALHO, 2001; SOUZA et al., 2003), confirmando intensa circulação viral.

A distribuição sazonal das gastroenterites por RV no Brasil assume duas configurações bem distintas, em consonância com os padrões registrados no mundo, onde regiões de clima temperado apresentam um padrão de distribuição sazonal bem marcante e, nas regiões tropicais esta sazonalidade não é tão expressiva (COOK et al., 1990; PEREIRA et al., 1993; LINHARES, 1997). Assim, as regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, exibem marcante perfil sazonal, observando-se maior incidência nos meses com menores índices pluviométricos no ano (maio a setembro) (GOMES et al., 1991; TEIXEIRA et al., 1991; CARDOSO et al., 1992; STEWIEN et al., 1993). Nos estados das regiões Norte e Nordeste tal sazonalidade parece não se revelar tão evidente (LINHARES et al., 1983; STEWIEN et al., 1991). Em um estudo epidemiológico, relatando as características das infecções pelo RV em Goiás, de 1986 a 2000, realizado por Cardoso e colaboradores (2003), ocorreu variação nas freqüências de RV durante os anos analisados, sugerindo que essa condição pode estar relacionada com determinado genotipo G circulante e com as condições climáticas durante cada ano em particular.

Nos países onde ocorre o padrão de distribuição sazonal dos casos de rotavirose as crianças tendem a ser infectadas mais tardiamente, devido à falta da contínua exposição aos RV, assim como o oposto parece ocorrer nos países sem sazonalidade marcada, onde a tendência é a da infecção ocorrer mais precocemente (PEREZ-SCHAEL et al., 1999).

Alterações genômicas em RV parecem ocorrer mais freqüentemente nos países em desenvolvimento e tropicais, onde as condições climáticas favorecem a contínua transmissão viral (GOUVEA; BRANTLY, 1995).

Os RV gp A são amplamente reconhecidos como os maiores causadores de gastroenterite viral em crianças em todo o mundo (KAPIKIAN; CHANOCK, 1996). Para os seres humanos, os genotipos G (G1, G2, G3, G4) e os P (P[4] e P[8]) são os mais comumente encontrados em todo o mundo (GENTSCH et al., 1996). Na Índia, a associação do genotipo P[6] com G1, G2, G3, G4 ou G9 também é muito comum

(RAMACHANDRAN et al., 1996), As associações de genótipos mais comumente encontradas em todo mundo, como P[8],G1, P[4],G2, P[8],G3 e P[8],G4 foram várias vezes relatadas em levantamentos epidemiológicos realizados no Brasil (LINHARES et al., 1988; STEWIEN et al., 1994; TIMENETSKY; SANTOS; GOUVEA, 1994; LEITE et al., 1996). O sorotipo G9 tem sido sistematicamente identificado em grande número de casos de rotavirose em vários estudos epidemiológicos em todo o mundo (SANTOS; HOSHINO, 2005).

Muitos genótipos G, tipicamente de animais como bovinos e suínos, têm sido encontrados em humanos, assim como muitos genótipos característicos de infecções humanas, têm sido descritos em animais (GOUVEA; SANTOS; TIMENETSKY, 1994; ALFIERI et al., 1996; LEITE et al., 1996; SANTOS et al., 1998). Segundo estudos, no Brasil os genótipos G5, G8 e G10 contam para uma significativa proporção de casos de diarreia aguda infantil (GOUVEA et al., 1994; LEITE et al., 1996; SANTOS et al., 1998).

O sorotipo G3 tem sido encontrado em várias espécies animais, como leporinos, murinos, símios, caninos, eqüinos, bovinos e suínos, ocorrendo também em humanos (BROWNING et al., 1992; KAPIKIAN; CHANOCK, 1996).

Várias infecções mistas com dois ou mais genótipos G têm sido relatadas (LEITE et al., 1996; COLUCHI et al., 2002) assim como infecções heterólogas referentes aos sorótipos P, também têm sido detectadas. Estudos revelam o caráter de infecção mista pelo RV no Brasil bem superior ao descrito na literatura internacional (TIMENETSKY; SANTOS; GOUVEA, 1994; LEITE et al., 1996).

Estirpes não-usuais de RV humanos foram relatadas em países em desenvolvimento, como é o caso da amostra G5+G11, descrita no Brasil (TIMENETSKY et al., 1997). De acordo com Beards e colaboradores (1992) e Urasawa e colaboradores (1992), os sorótipos G6 e G10, que eram identificados somente em bovinos, foram descritos em crianças e recém-nascidos.

Técnicas moleculares têm demonstrado a existência de múltiplos alelos no segmento genômico correspondentes à proteína VP4, possibilitando a detecção de RV gp A com genes VP4 semelhantes que circulam, simultaneamente, em humanos e espécies animais (ESTES; COHEN, 1989; GORZIGLIA et al., 1990).

O processo de recombinação *in vivo* entre as estirpes de RV de origem humana e animal pode ser um importante mecanismo de diversidade genética para os RV (NAKAGOMI et al., 1990; ALFIERI, 1996).

A prevalência e a significância das infecções causadas pelos RV não-gp A permanecem incógnitas devido à falta de procedimentos de rotina para diagnóstico.

Contudo, os gp B e C de RV têm sido associados com diarreia humana em diferentes partes do mundo (SAIF; JIANG, 1994; TEIXEIRA et al., 1998).

Os RV gp C têm sido apontados na gênese de gastroenterites humanas, associados a surtos de diarreia em situações que onde há a formação de grupamentos humanos, como por exemplo, escolas e mesmo o convívio familiar (MATSUMOTO et al., 1989; MAUNULA; SVENSSON; BONSDORFF, 1992). No Brasil, os primeiros relatos são de Pereira e colaboradores (1983). Vários estudos subseqüentes permitiram a detecção de RV gp C em amostras de fezes de crianças e adultos (GABBAY et al., 1989; TEIXEIRA et al., 1998; SOUZA et al., 1998; ALFIERI et al., 1999). Estudos quanto à dinâmica da aquisição de anticorpos para o RV gp C indicaram que a infecção não é comum entre crianças com idades inferiores a cinco anos, com a progressão etária, registrou-se aumento gradual nos índices de positividade (COX et al., 1998).

## **2.4 IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DA GENOTIPAGEM**

O monitoramento dos genotipos de RV envolvidos em diarreias destaca-se pelo fornecimento de importantes informações epidemiológicas, como distribuição sazonal dos genotipos, co-circulação de diferentes genotipos, freqüência de infecções mistas, determinação de estirpes de genotipos não identificados e novos genotipos. Considerando-se que os RV apresentam distribuição mundial e grande diversidade de hospedeiros, o monitoramento fornece dados relativos à caracterização de infecções interespecies (CONNER; MATSON; ESTES, 1994).

Medidas relativas aos aspectos nutricionais e de caráter higiênico-sanitário, tanto em medicina humana quanto veterinária, adotadas em países desenvolvidos, não são capazes de reduzir significativamente o número e a gravidade das infecções pelo RV (BERN; GLASS, 1994; CICIRELLO; GLASS, 1994).

A genotipagem constitui ferramenta indispensável ao estudo de fatores epidemiológicos das rotavirose em grandes populações, além de propiciar informações ao desenvolvimento de vacinas (GOUVEA; SANTOS; TIMENETSKY, 1994; GENTSCH et al., 1996).

Na área imunoprolifática as rotavirose apresentam fator complicador devido às variabilidades antigênicas e moleculares. Vacinas monovalentes, testadas preliminarmente, não foram capazes de induzir imunidade heterotípica em crianças e

em animais que não tenham sido previamente expostos ao RV (HARDY et al., 1991; CONNER; MATSON; ESTES; 1994).

Em agosto de 1998, a *Food and Drug Administration* (FDA), Estados Unidos, licenciou a vacina tetravalente contra RV (*rhesus-human reassortant rotavirus tetravalent vaccine* RRV-TV) denominada *Rotashield*®, para uso rotineiro via oral, em três doses. A vacina licenciada consistia de uma composição de três especificidades antigênicas para G1, G2 e G4, obtidas por reestruturação *in vitro*, envolvendo RV de origem humana e símia (RRV) e a própria estirpe RRV, homóloga ao genotipo G3. Em julho de 1999, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC, Atlanta), recomendou o adiamento das vacinações após o surgimento de casos de intussuscepção intestinal entre lactentes que receberam a vacina. Os casos ocorreram, com maior frequência, nas duas semanas após vacinação com a RRV-TV, principalmente após a primeira dose (BERNSTEIN et al., 1999). Em outubro de 1999, o Comitê em Práticas de Imunização, nos Estados Unidos, optou por cancelar a recomendação do uso da vacina RRV-TV (CDC, 1999).

Os experimentos conduzidos com vacinas recombinantes em diferentes países desenvolvidos apresentaram eficácia maior quando comparados com os resultados de países em desenvolvimento. Esses resultados diferentes devem ser considerados, pois nos países em desenvolvimento há inúmeras infecções mistas, bem como deve ser avaliada a possibilidade de transmissão interespécies e também de recombinação gênica (GLASS; GENTSCH; SMITH, 1994).

No momento, duas candidatas a vacinas contra RV estão em testes. A vacina designada *Rotarix*® (*GlaxoSmithKline*) é uma vacina atenuada, monovalente, para o sorotipo humano P1A,G1. A candidata *Rotateq*® (*Merck*) é uma vacina atenuada, pentavalente, que utiliza estirpe bovina com genes humanos para os sorotipos G1, G2, G3, G4 e P1A. Ambas as vacinas encontram-se em fase de testes clínicos (CLARK ; OFFIT, 2004).

Tanto o desenvolvimento quanto a monitoração de uma vacina eficaz para os RV dependem de informações sobre a frequência e a distribuição dos genotipos P e G nas populações alvo, uma vez que genotipos distintos podem não induzir proteção heterotípica, principalmente nas primo-infecções (THEIL, 1990; SAIF, 1991; KAPIKIAN, 1994; GENTSCH et al., 1996).



### 3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

**EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO DOS GENOTIPOS P (VP4) E G (VP7) DE *ROTAVIRUS* GRUPO A HUMANO NO ESTADO DO PARANÁ, 2000-2003.**

## RESUMO

No período de janeiro de 2000 a dezembro de 2003 foram colhidas, em várias regiões geográficas do Estado do Paraná, 550 amostras fecais de crianças e adultos com quadro clínico de diarreia aguda. Por meio de ensaio imunoenzimático comercial, 120 (21,8%) amostras foram positivas para o rotavírus grupo A. Dessas, 114 amostras foram genotipadas por meio da *multiplex-nested-PCR*. A maior frequência (77,5%) de amostras positivas (n=93) foi observada em crianças menores de cinco anos de idade. A maior concentração de casos positivos para o rotavírus ocorreu nos meses frios e secos dos quatro anos avaliados. Os genótipos de maior ocorrência foram: G1 (50,9%), G4 (9,6%), G9 (7,0%), G2 (1,7%), G3 (0,9%), P[8] (71,9%) e P[4] (3,5%). As associações de P e G genótipos mais encontradas foram: P[8],G1 (46,5%) e P[8],G4 (9,6%). Infecções mistas, caracterizadas por estirpes de rotavírus com mais de um genótipo G, P e amostras não-genotipadas foram observadas, respectivamente, em 8,8%, 3,5% e em 16,7% das amostras. De forma semelhante ao que vem ocorrendo em várias partes do mundo a identificação do genótipo G9 em amostras de rotavírus identificadas ao longo dos quatro anos do estudo ratifica a emergência desse genótipo também no Estado do Paraná.

**Palavras-chaves:** diarreia, rotavírus, diagnóstico, EGPA, genótipos, RT-PCR

## ABSTRACT

In the period of January/2000 to December/2003, 550 fecal samples from children and adults, with acute diarrhea, were collected in several geographical regions of Paraná State. By enzyme immunoassay 120 samples (21.8%) were positive to group A rotaviruses. These, 114 samples were genotyped by multiplex-nested-PCR. The higher frequency (77.5%) of positive samples (n=93) was observed in children under 5 years old. In the cold and dry seasons of the four evaluate years was observed the greatest concentration of the rotavirus positive cases. The genotypes of major occurrence were: G1 (50.9%), G4 (9.6%), G9 (7.0%), G2 (1.7%), G3 (0.9%), P[8] (71.9%) and P[4] (3.5%). The main combinations found to P and G genotypes were: P[8],G1 (46.5%) and P[8],G4 (9.6%). Mixed infections, characterized by rotaviruses with more than one genotype G, P, and nontypeable rotavirus were observed, respectively, in 8.8%, 3.5% and 16.7% of samples. The identification of G9 genotype in rotavirus samples tested along four years of studies ratifies the emergency of this genotype also in Paraná State, as worldwide.

**Key words:** diarrhea, rotavirus, diagnostic, PAGE, genotypes, RT-PCR

## INTRODUÇÃO

A diarreia infecciosa aguda é a causa mais comum de morbidade e mortalidade em crianças nos países em desenvolvimento, e é responsável por 25 a 30% das mortes registradas em crianças menores de cinco anos, representando 2,5 milhões de óbitos por ano. Os rotavírus são os mais importantes agentes etiológicos da diarreia aguda em crianças em todo o mundo. Anualmente os rotavírus causam, aproximadamente, 111 milhões de episódios de gastroenterites que requerem tratamento domiciliar, 25 milhões de visitas clínicas, dois milhões de hospitalizações e de 352.000 a 592.000 mortes de crianças menores de cinco anos de idade em todo o mundo. Aproximadamente 82% das mortes de crianças devido à rotavirose ocorrem em países em desenvolvimento <sup>29</sup>.

Os rotavírus são membros da família *Reoviridae*. A partícula completa do vírus apresenta cerca de 100 nm de diâmetro e possui capsídeo protéico triplo, composto por uma camada externa, uma camada intermediária e uma camada interna (*core*) <sup>33</sup>. O genoma viral consiste de 11 segmentos de RNA fita dupla (RNAfd), localizado no interior do *core*. Cada um desses genes codifica uma proteína, exceto o gene 11 que, aparentemente, codifica dois polipeptídeos distintos, resultando em seis proteínas estruturais e seis não-estruturais <sup>27</sup>.

Três especificidades antigênicas, representando grupo, subgrupo e sorotipo, são atribuídas aos rotavírus. Os determinantes antigênicos tanto para grupo quanto para subgrupo são mediados principalmente pela VP6, que é a principal proteína do capsídeo intermediário. Sete grupos sorológicos distintos, denominados de A a G, são descritos em rotavírus provenientes de seres humanos, outros animais mamíferos e de aves. O Rotavírus grupo A é a causa mais comum de gastroenterite aguda em crianças em todo o mundo <sup>19</sup>.

As duas proteínas do capsídeo externo, VP7 e VP4, constituem a base de um sistema binário de classificação para os rotavírus em G tipos derivados da glicoproteína VP7, e em P tipos derivados da VP4 que é uma proteína sensível à protease. Atualmente são descritos 15 genótipos G e 21 genótipos P em amostras de rotavírus do grupo A <sup>34</sup>. Devido às proteínas VP7 e VP4 serem codificadas por diferentes segmentos de RNA várias combinações de G e P tipos podem ser observadas acarretando em um sistema duplo de genotipagem. A maioria dos G tipos podem ser sorologicamente confirmados, não ocorrendo o mesmo com os P tipos <sup>10</sup>.

Os tipos G1, G2, G3 e G4 constituem mais de 80% de todos os genótipos G humanos detectados em todo o mundo. Para os genótipos P, o P[8] é o mais comumente encontrado, seguido pelos genótipos P[4] e P[6]. Estudos de genotipagem indicam que quatro combinações para os genótipos P e G, representadas por P[8],G1, P[4],G2, P[8],G3 e P[8],G4 são as mais freqüentes em estirpes de rotavírus do grupo A identificadas em todo o mundo, seguidas pelas combinações P[8],G9 e P[6],G9 <sup>36</sup>.

Embora as taxas de morbidade e mortalidade relacionadas à rotavirose sejam similares tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, a doença é freqüentemente grave e fatal entre crianças e recém-nascidos que vivem nos países em desenvolvimento, onde a desnutrição pode ser um fator adicional <sup>19</sup>. O sucesso de programas de prevenção da rotavirose, com o uso de vacinas, é dependente dos genótipos de rotavírus presentes na população. Com isso, o monitoramento das estirpes circulantes, particularmente nas regiões em desenvolvimento, torna-se uma ferramenta fundamental tanto na implantação quanto no monitoramento de programas imunoproláticos para essa infecção.

O objetivo desse estudo, de caráter retrospectivo, foi avaliar alguns parâmetros epidemiológicos da rotavirose em diferentes regiões geográficas do Estado do Paraná

e caracterizar os genótipos G e P de rotavírus do grupo A identificadas em amostras fecais provenientes de crianças e adultos com quadro clínico de diarreia aguda.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### Amostras clínicas e detecção viral

No período de janeiro de 2000 a dezembro de 2003 foram avaliadas 550 amostras fecais, provenientes de crianças e adultos com quadro clínico de diarreia aguda, encaminhadas aos serviços de saúde pública de 38 municípios do Estado do Paraná e enviadas ao LACEN-PR para o diagnóstico de rotavírus. As suspensões foram preparadas pela diluição do material fecal (10-20% p/v) em tampão salina-fosfato (PBS) pH 7,2 (137 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), seguida de homogeneização e clarificação a 2000 g por 15 min a 4 °C. Todas as suspensões fecais foram avaliadas quanto à presença de rotavírus por meio de um *kit* de ensaio imunoenzimático para o diagnóstico do rotavírus grupo A e adenovírus<sup>31</sup> (EIARA), produzido por Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, seguindo as recomendações do fabricante. As amostras positivas permaneceram armazenadas a - 70 °C.

### Extração do RNA

Para a extração do RNA viral, foram utilizadas as amostras fecais que apresentaram resultado positivo pelo ensaio imunoenzimático para rotavírus grupo A. Inicialmente foram preparadas suspensões fecais a 10% (p/v) para as fezes semi-sólidas ou 50% (v/v) para as fezes líquidas em tampão TRIS-Cálcio (pH 7,2). As suspensões foram homogeneizadas, centrifugadas por 10 min a 1200 g, e os sobrenadantes armazenados em -20 °C. Alíquotas de 450 µL de cada suspensão fecal

foram tratadas com 50 µL de SDS 10%, homogeneizadas por agitação e aquecidas a 56°C por 20 min. Para a extração do RNAfd foi utilizada a combinação dos métodos fenol-clorofórmio-álcool isoamílico e sílica-isotiocianato de guanidina, descrita por Alfieri e colaboradores <sup>2</sup> com pequenas modificações. À fração anterior foram adicionados 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). Após homogeneização, aquecimento a 56°C por 15 min e centrifugação a 10.000 g por 10 min o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e processado pelo método da sílica/isotiocianato de guanidina <sup>3</sup>. O RNAfd foi eluído da sílica pela adição de 50 µL de água ultra pura autoclavada (*MilliQ*®) e incubação por 15 min em 56°C e centrifugação em 10.000 g durante 3 min. O sobrenadante foi mantido a -20°C até a sua utilização nas técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR). Alíquotas de água ultra-pura autoclavada foram incluídas como controle negativo em todos os procedimentos de extração do ácido nucleico.

#### EGPA – Eletroforese em gel de poliacrilamida

A identificação do RNAfd do rotavírus e a análise do perfil de migração (eletroferotipos) dos 11 segmentos genômicos do rotavírus grupo A foram realizadas por meio da técnica de EGPA, seguida de coloração pela prata, realizada de acordo com os procedimentos descritos por Herring e colaboradores <sup>17</sup> e Pereira e colaboradores <sup>30</sup>.

#### RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa

A transcrição reversa foi realizada com 2 µL, 5 µL ou 7 µL do RNAfd extraído e 20 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) consensuais 4con3 e 4con2 <sup>12</sup>, utilizados para a amplificação de um fragmento de 876 pb do gene da VP4 (P), ou

9con1 e 9con2<sup>8</sup>, que amplificam um fragmento de 904 pb do gene da VP7 (G). A mistura foi desnaturada a 97°C por 5 min e rapidamente transferida para banho de gelo por 3 min. Após essa etapa foi adicionada a solução de RT-Mix constituída por 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x PCR *buffer* (20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl), 0,5 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 30 U *Superscript<sup>TM</sup>* I (Invitrogen<sup>TM</sup>, Life Technologies, EUA) e água ultra-pura autoclavada para o volume final de 20 µL. Após homogeneização e rápida centrifugação, a síntese do cDNA foi realizada em termociclador (PTC-200, MJ Research Co, EUA) a 42°C durante 40 min.

Aos 20 µL da reação de RT foi adicionada uma solução contendo 20 pmol de cada *primer* consensual para os genes VP4 ou VP7, 0,4 mM de cada dNTP, 1x PCR *buffer*, 1,25 U da enzima Platinum<sup>®</sup> Taq DNA polimerase (Invitrogen<sup>TM</sup>, Life Technologies, EUA). A amplificação foi realizada em termociclador e consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 3 min, 40 ciclos de 94°C por 45 s, 45°C por 45 s e 72°C por 1 min, seguidos por uma etapa de extensão final a 72°C por 10 min.

#### Genotipagem por *Multiplex Nested-PCR*

Diluições a partir de 1:10, 1:100 ou 1:1000 do produto da PCR foram utilizadas como molde (*template*) para a segunda etapa de amplificação. Alíquotas de 1 µL das diluições, juntamente com 20 pmol do *primer* consensual 9con1 e de um *pool* de *primers* específicos para os genótipos G, ou do *primer* consensual 4con3 e um *pool* de *primers* específicos para os genótipos P foram desnaturados a 97°C por 5 min e rapidamente transferidos para banho de gelo por 3 min. Os *primers* genótipo-específicos utilizados para a genotipagem do gene G foram o *pool* 9T1-1 (G1), 9T1-2 (G2), 9T-3P (G3), 9T-4 (G4)<sup>8</sup> e FT5 (G5)<sup>16</sup>; o *pool* de HT8 (G8)<sup>16</sup>, 9T-9B (G9)<sup>8</sup> e ET10 (G10)<sup>16</sup> e o *pool* de DT6 (G6) e BT11 (G11)<sup>16</sup>. Os *primers* genótipo-específicos empregados para a determinação dos genótipos P foram o *pool* 2T-1 (P[4]), 3T-1 (P[6]),



1T-1 (P[8]) e 4T-1 (P[9])<sup>12</sup>. O *primer* pNCDV<sup>15</sup>, específico para o genótipo P[1] foi utilizado juntamente com o *primer* consensual 4con2.

A N-PCR foi realizada em uma solução contendo 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de cada dNTP, 1x PCR *buffer*, 1,25 U da enzima Platinum<sup>®</sup> Taq DNA polimerase e água ultra pura autoclavada para o volume final de 25 µL. O processo de amplificação foi realizado em termociclador e consistiu de um ciclo inicial a 94°C por 3 min; 40 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 2 min e 72°C por 1 min; seguidos de uma etapa de extensão final a 72°C por 10 min.

#### Análise dos produtos da RT-PCR e da N-PCR

Alíquotas de 10 µL dos produtos da primeira e da segunda amplificação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (RT-PCR) e 2,5% (N-PCR) em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris-borato, 2 mM EDTA) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, sob voltagem constante (90V) durante, aproximadamente, 30 min. O gel foi visualizado sob luz ultra-violeta.

#### Análise estatística

O teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para a análise dos dados relativos à faixa etária e à distribuição sazonal dos casos de rotavirose.

## RESULTADOS

Das 550 amostras fecais analisadas pelo EIARA, 120 (21,8%) foram positivas para os rotavírus grupo A. Dessas, 6 (5,0%) amostras não apresentavam material suficiente para a continuidade das análises, restando 114 (95,0%) amostras que foram selecionadas para os trabalhos de genotipagem. Todas as 114 amostras avaliadas pela técnica de EGPA foram positivas e a análise do perfil eletroforético possibilitou a

caracterização do eletroferogrupo A, com a distribuição característica (4-2-3-2-) dos 11 segmentos genômicos do grupo A de rotavírus. Pequenas diferenças no eletroferotipo foram observadas, destacando-se uma amostra que apresentou perfil eletroforético curto em relação ao padrão de migração dos segmentos genômicos 10 e 11.

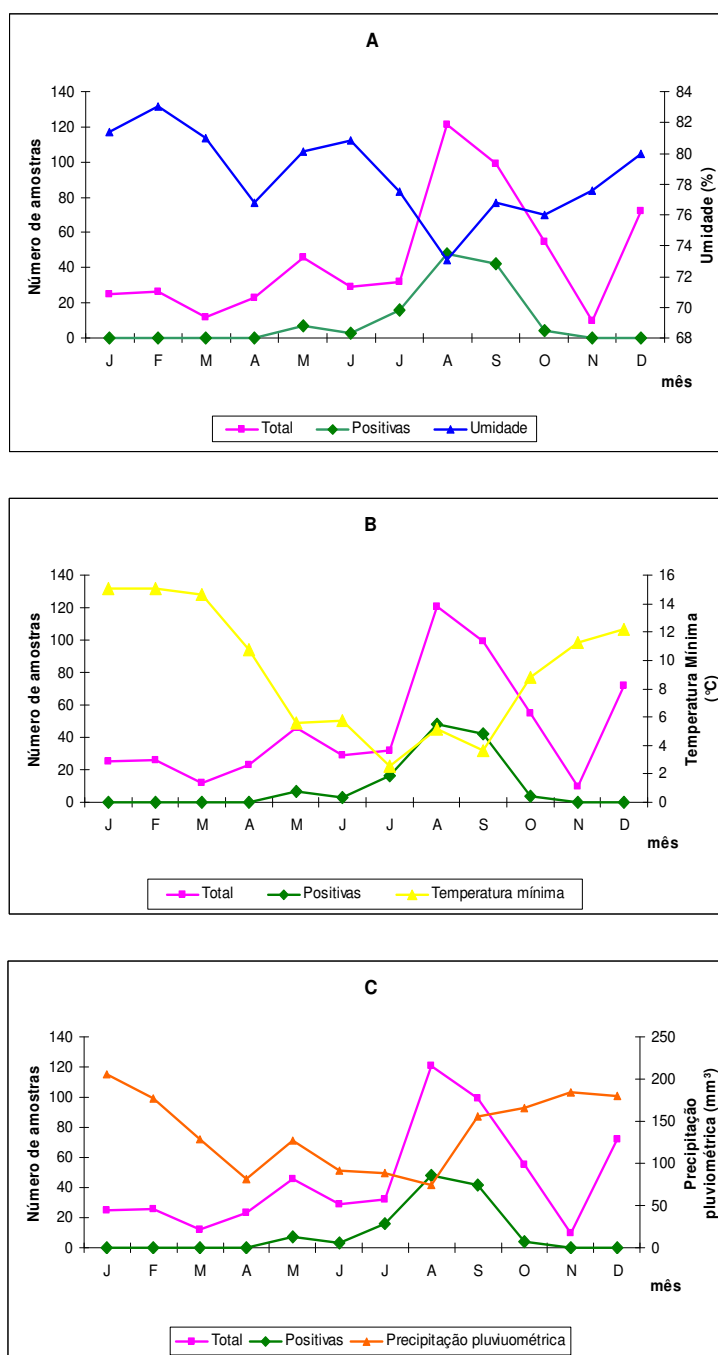
Em relação às faixas etárias foi observado, com freqüência significativa, os rotavírus foram detectados principalmente em crianças menores de cinco anos de idade ( $\chi^2 = 28.07$ ,  $p < 0,0001$ ). As maiores freqüências de amostras positivas para o rotavírus grupo A ocorreram em crianças nas faixas etárias de zero a dois anos, com 56 (46,7%) amostras positivas, e de dois a cinco anos, com 37 (30,8%) amostras positivas (Tabela 1).

Durante os quatro anos do estudo a freqüência de diagnóstico de rotavírus variou de acordo com o período de coleta das amostras durante todos os anos do estudo. Diferença significativa foi verificada no número de casos de rotavirose entre os meses de julho a setembro ( $\chi^2 = 119,57$ ,  $p < 0,0001$ ) (figura 1).

**TABELA 1.** Freqüência de diagnóstico do rotavírus grupo A, realizado por ensaio imunoenzimático e eletroforese em gel de poliacrilamida, em seres humanos com diarreia aguda, distribuída de acordo com a faixa etária. Estado do Paraná, Brasil, 2000-2003.

Grupo etário (anos)	No. de amostras positivas / No. de casos (%)
0  — 1	25 / 101 (24,7%)
1  — 2	31 / 102 (30,4%)
2  — 3	20 / 61 (32,8%)
3  — 4	13 / 43 (30,2%)
4  — 5	4 / 19 (21,0%)
5  — 15	13 / 62 (21,0%)
≥ 15	8 / 131 (6,1%)
ND*	6 / 31 (19,3%)
TOTAL	120 / 550

ND\*: nenhum dado foi registrado.



**FIGURA 1:** Distribuição da freqüência de casos de diarreia aguda (n=550) em seres humanos e de diagnóstico de rotavírus grupo A (n=120), de acordo com fatores climáticos. Estado do Paraná, Brasil, 2000-2003. Painel A: Média da umidade relativa do ar (%); Painel B: Média da temperatura mínima (°C); Painel C: Média do índice pluviométrico (mm<sup>3</sup>). Dados do Serviço de Informação Meteorológica do Estado do Paraná (SIMEPAR).

Rotavírus identificados em 85 (74,5%) espécimes fecais foram genotipados para pelo menos um dos tipos P e G analisados; 10 (8,8%) amostras foram genotipadas somente para P ou G tipo e 19 (16,7%) amostras foram consideradas como não-tipáveis. Com relação aos genótipos G foram encontrados os seguintes resultados para infecções singulares: G1 (50,9%), G4 (9,6%), G9 (7,0%), G2 (1,7%) e G3 (0,9%); e para infecções mistas: G1+G4, G1+G9, G4+G9, G1+G2+G4 e G1+G4+G9 (8,8%). O genótipo P[8] foi observado em 71,9% (n=82) do total de amostras analisadas e tanto o genótipo P[4] quanto as infecções mistas contendo os genótipos P[4]+P[8] foram identificados igualmente em 3,5% (n=4) das amostras.

As combinações de P e G genótipos mais frequentemente encontradas foram P[8],G1 (46,5%) e P[8],G4 (9,6%). A Tabela 2 apresenta os genótipos G e P encontrados nas 114 amostras de rotavírus grupo A incluídas nesse estudo.

**TABELA 2.** Genótipos G (VP7) e P (VP4) de rotavírus grupo A, identificados por multiplex-nested-PCR, em amostras de fezes (n=114) de crianças e adultos com diarreia aguda. Estado do Paraná, Brasil, 2000-2003.

genótipo G	No. de amostras com genótipo P (%)			No. de amostras com P NT <sup>a</sup>	Total
	P[4]	P[8]	P[4] + P[8]		
G1		53 (46,5%)	4 (3,5%)	1 (0,9%)	58 (50,9%)
G2	2 (1,7%)				2 (1,7%)
G3		1 (0,9%)			1 (0,9%)
G4		11 (9,6%)			11 (9,6%)
G9		4 (3,5%)		4 (3,5%)	8 (7,0%)
G1 + G4		4 (3,5%)			4 (3,5%)
G1 + G9	1 (0,9%)	2 (1,7%)			3 (2,6%)
G1 + G2 + G4		1 (0,9%)			1 (0,9%)
G1 + G4 + G9		1 (0,9%)			1 (0,9%)
G4 + G9		1 (0,9%)			1 (0,9%)
G NT <sup>a</sup>	1 (0,9%)	4 (3,5%)		19 (16,7%)	24 (21,1%)
Total	4 (3,5%)	82 (71,9%)	4 (3,5%)	24 (21,1%)	114 (100%)

<sup>a</sup> NT – genótipos não-tipáveis

## DISCUSSÃO

A maior frequência de diagnóstico de rotavírus grupo A (77,5%) foi observada, como esperado, principalmente entre crianças menores de cinco anos de idade. Uma amostra positiva foi identificada em um recém-nascido com seis dias de vida, sendo que nesse caso não foi possível determinar o genotipo. A frequência da infecção pelo rotavírus em neonatos não tem sido sistematicamente investigada, mas estudos indicam que as infecções geralmente são causadas por estirpes não-usuais, e que na maioria das vezes, os casos são assintomáticos<sup>5, 8</sup>. Em adultos, foi identificado um caso de rotavirose que ocorreu em um paciente idoso, sendo que nos outros casos em adultos a idade foi variável e o fator que pode ter influenciado a infecção não pôde ser avaliado. Estudos epidemiológicos mostram que as infecções por rotavírus grupo A em adultos são usualmente subclínicas, mas ocasionalmente causam doença nos pais ou familiares próximos das crianças com rotavirose, em pacientes imunocomprometidos e em idosos<sup>28</sup>. Na presente investigação, o alto número de amostras de fezes provenientes de adultos e direcionadas para o diagnóstico de rotavirose pode ser atribuído a casos de gastroenterite aguda causadas por rotavírus não-grupo A ou a outros agentes etiológicos.

O padrão de distribuição sazonal das rotaviroses demonstrou o grande número de casos positivos, principalmente durante os meses mais frios e secos de cada ano avaliado. Em países de clima temperado os rotavírus apresentam um padrão de infecção sazonal bem marcante, com picos epidêmicos ocorrendo nos meses mais frios e secos de cada ano, sendo que esse padrão não ocorre uniformemente em regiões tropicais<sup>20</sup>. No Brasil, há diferentes frequências sazonais na distribuição dos rotavírus, devido às variações climáticas de cada região<sup>32</sup>. Vários estudos demonstram que a sazonalidade dos casos de rotavirose está correlacionada com a redução da umidade

relativa do ar <sup>4, 6, 37</sup>, resultando em maior viabilidade das partículas virais e aumento da dispersão por aerossóis.

Na única amostra de rotavírus grupo A que por EGPA apresentou o padrão eletroforético curto, diferente de todas as demais amostras que apresentaram o perfil característico longo, foi identificado o genotipo P[4],G2. Outros estudos também associaram esse genotipo ao perfil eletroforético curto <sup>6, 24</sup>, mesmo assim não há absoluta correlação entre determinados genotipos e os padrões eletroforéticos apresentados.

Apesar dos rotavírus serem espécie-específicos, a transmissão interespecies também é possível. Vários estudos têm encontrado evidências de rearranjo *in vivo* de diferentes estirpes de rotavírus grupo A provenientes de seres humanos e também entre estirpes identificadas em humanos e animais <sup>7</sup>. Estirpes de rotavírus comumente encontradas em animais, como os genotipos G3, G5, G6, G8, G9, G10, e P[6], P[9], P[11] P[14] P[19] têm sido identificadas na população humana em todo o mundo <sup>9</sup>. O genotipo G5, mais comum da espécie suína tem sido descrito em infecções humanas <sup>1, 39</sup>. Entretanto, nenhum genotipo G5 foi observado na presente investigação, como também não foram evidenciadas infecções heterólogas.

O genotipo G1 foi o mais freqüente nesse estudo, estando presente como infecção singular em 50,9% (n=58) das amostras de rotavírus analisadas e como infecção mista em 7,9% (n=9) dos casos. O segundo genotipo G com maior freqüência de identificação foi o G4, que apresentou em infecções singulares e infecções mistas as proporções de 9,6% (n=11) e 6,2% (n=7), respectivamente. Vários estudos mostram que os genotipos G1, G2, G3 e G4, juntos somam mais de 80% das estirpes de rotavírus grupo A circulantes em populações humanas de praticamente todo o mundo. Em algumas regiões, outros genotipos G apresentam-se também como sendo epidemiologicamente importantes <sup>36</sup>. No México, o sorotipo G2 foi associado a 92% dos

casos de gastroenterite em crianças <sup>14</sup>. Na região Norte do Brasil, os genótipos G1 (50%) e G2 (30%) foram os mais prevalentes em estudo realizado entre 1983 e 1985 <sup>22</sup>. Em estudo posterior, desenvolvido na mesma região, foram encontrados os genótipos G1 (65%), G2 (30%), G3 (1.2%), G4 (4.6%) e G9 (1.2%) <sup>23</sup>. Estudos conduzidos por Pereira e colaboradores <sup>30</sup>, a partir de um inquérito nacional envolvendo 14 estados brasileiros, de 1981 a 1990, identificaram os genótipos G1, G2, G3, G4 com freqüências de 42%, 24%, 16% e 18%, respectivamente. Em escala universal, as freqüências predominantes dos genótipos G demonstram nítida flutuação e essa diversidade, presente em diferentes regiões, confirma a necessidade do monitoramento contínuo das estirpes de rotavírus circulantes entre humanos.

A ocorrência do genótipo G9, presente como genótipo único em 7,0% (n=8) das estirpes e em 4,4% (n=5) como parte de uma infecção mista, observada nesse estudo em diferentes localidades do Estado e ao longo dos anos avaliados, confirma a evidente e ampla distribuição geográfica desse genótipo, que também já vem sendo detectado desde 1995 em vários países. Este resultado reforça a possibilidade de que o genótipo G9 pode representar o quinto genótipo globalmente mais distribuído <sup>36</sup>.

A ocorrência das infecções mistas para G tipos observados nesse estudo confirma a indicação de que em países em desenvolvimento a sua freqüência é mais alta <sup>18, 21</sup>, fato que pode estar relacionado a uma exposição maior a diversos genótipos e também aos meios de transmissão dos vírus.

A diversidade para os genótipos P foi menor que a encontrada para os genótipos G, sendo o genótipo P[8] predominante na amostragem avaliada. Em vários estudos, resultados semelhantes são freqüentemente encontrados em todo o mundo <sup>11, 36</sup>.

Na presente investigação as estirpes de rotavírus grupo A de maior ocorrência apresentaram o genótipo P[8] em combinação com G1 (46,5% em infecção simples, 53,5% em infecção simples e mista) e com G4 (9,6% em infecção simples, 15,8% em

infecção simples e mista). Em escala global esses resultados são similares aos encontrados em outras partes do mundo <sup>13</sup>. Em estudo realizado com pacientes internados em pediatrias de Belém, Pará, Brasil <sup>25</sup>, entre os anos de 1992-1993, os genótipos P[4] e P[8] em combinação com o genótipo G2, foram observados em 50% e 28,6%, respectivamente, das amostras. Esses resultados sugerem que os genótipos P e G de rotavírus parecem co-circular em um mesmo país com freqüências que podem diferir de uma região para a outra. Adicionalmente, parece provável que as diferenças nos genótipos também possam ser atribuídas à origem da infecção, ou seja, se adquirida na comunidade ou no ambiente hospitalar. O genótipo P[6] em associação com diferentes genótipos G tem sido mencionado em vários estudos como emergente, sendo registrado em casos assintomáticos de rotavirose em neonatos, e entre crianças com gastroenterite aguda, hospitalizadas ou não, porém em nossa investigação esse genótipo não foi observado <sup>36, 38, 39</sup>. No presente estudo, embora tenham sido detectadas infecções mistas para os genótipos P ou G, nenhuma amostra analisada apresentou infecção mista simultânea para os dois genótipos. Esses resultados necessitam de futuras confirmações, uma vez que eles podem representar genótipos G ou P não-tipáveis co-infectando o mesmo paciente. Outra explicação possível seria a presença de co-infecção com estirpes de rotavírus para os genótipos P ou G idênticas. Os resultados de amostras não-tipáveis para os genótipos P e/ou G podem estar relacionados a genótipos não investigados nesse estudo ou à necessidade do uso de *primers* degenerados para determinados genótipos visando aumentar a sensibilidade dos resultados.

Como o uso de uma vacina em larga escala para o controle da rotavirose é eminente, evidencia-se a importância da rotina de vigilância epidemiológica com o objetivo de identificar os genótipos G e P mais freqüentes em amostras de rotavírus grupo A circulantes entre crianças com gastroenterite aguda. Embora respostas



homotípicas para os sorotipos G pareçam ser predominantes, numerosos estudos envolvendo humanos e outros modelos animais têm demonstrado que respostas heterotípicas são comumente elicitadas, até mesmo após uma infecção primária. Há evidências de que anticorpos maternos são importantes para a proteção contra episódios graves de gastroenterite aguda em recém-nascidos <sup>35</sup>. Atenção particular deve ser dada na caracterização dos genotipos P, principalmente, devido aos estudos que suportam a hipótese de que a VP4 pode ser mais efetiva em induzir anticorpos neutralizantes vírus-específicos, durante a infecção natural <sup>26</sup>. Em escala global, assim como no presente estudo, a associação P[8],G1 é comumente encontrada, resultado esse que pode servir como base para o uso da vacina humana monovalente específica para esse genotipo (*Rotarix*<sup>TM</sup> Glaxo Smithkline and Avant Immunotherapeutics, Inc, Needham, MA, EUA). O fato de que vários estudos demonstram o aumento nas taxas de identificação do genotipo G9 reforça a possibilidade de que novos e emergentes sorotipos possam ser importantes nas estratégias vacinais.

A combinação dos genotipos, observada na presente investigação e em vários outros estudos, demonstra que a diversidade genotípica dos rotavírus exibe tanto um padrão geográfico quanto temporal. O monitoramento dos rotavírus em todo o mundo deve contribuir para o sucesso de futuros programas de prevenção, principalmente, em países em desenvolvimento onde os casos de gastroenterite aguda são freqüentemente responsáveis por muitos óbitos a cada ano.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN/PR) pelo fornecimento das amostras clínicas.

Ao SIMEPAR pelo fornecimento dos dados meteorológicos

O presente trabalho contou com recursos financeiros provenientes das seguintes agências de fomento à pesquisa: CNPq, CAPES e Fundação Araucária (FAP/PR).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alfieri AA, Leite J, Nakagomi O, Kaga E, Woods P, Glass RI, Gentsch JR. Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe hybridization and sequence. *Archives of Virology* 141:2353-2364, 1996.
2. Alfieri AF, Alfieri AA, Barreiros MA, Leite JP, Richtzenhain LJ. G and P genotypes of group A rotavirus circulating in calves in Brazil, 1996-1999. *Veterinary Microbiology* 99(3-4):167-173, 2004.
3. 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. *Journal of Clinical Microbiology* 28(3) 495-503, 1990.
4. Cardoso DD, Soares CM, Souza MB, Azeredo MS, Martins RM, Queiroz DA, Brito WM, Mumford V, Racz ML, Queiroz DA. Epidemiological Features of Rotavirus Infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98(1):25-29, 2003.
5. Cicirello HG, Das BK, Gupta A, Bhan MK, Gentsch JR, Kumar R, Glass RI. High prevalence of rotavirus infection among neonates born at hospitals in Delhi, India: predisposition of newborns for infection with unusual rotavirus. *Pediatrics Infectious Diseases Journal* 13:720-724, 1994.
6. Coluchi N, Mumford V, Manzur J, Vazquez C, Escobar M, Weber E, Marmol P, Racz ML. Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of Rotavirus strains in children with acute diarrhea in Paraguay. *Journal of Clinical Microbiology* 40(5):1709-1714, 2002.

7. Cunliffe NA, Gondwe JS, Broadhead RL, Molyneaux ME, Woods PA, Bresee JS, Glass RI, Gentsch JR, Hart CA. Rotavirus G and P types in children with acute diarrhea in Blantyre, Malawi, from 1997-1998: predominance of a novel P [6] G8 strain. *Journal of Medical Virology* 57(3):308-312, 1999.
8. Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, Kumar R, Bhan MK, Glass RI. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Dehli, India. *Journal of Clinical Microbiology* 32:1820-1822, 1994.
9. Desselberger U. Emerging and re-emerging infectious diseases. *The Journal of Infection* 40(1):3-15, 2000.
10. Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews* 53:410-449, 1989.
11. Fang ZY, Yang H, Qi J, Zhang J, Sun LW, Tang JY, Ma L, Du ZQ, He AH, Xie JP, Lu YY, Ji ZZ, Zhu BQ, Wu HY, Lin SE, Xie HP, Griffin DD, Ivanoff B, Glass RI, Gentsch JR. Diversity of rotavirus strains among children with acute diarrhea in China: 1998-2000 surveillance study. *Journal of Clinical Microbiology* 40:1875-1878, 2002.
12. 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. *Journal of Clinical Microbiology* 30:1365-1373, 1992.
13. Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri AA, Kunmar R, Bhan MK, Glass RI. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *Journal of Infectious Diseases* 174(1):S30-S36, 1996.
14. Gonzales-loza MR, Polanco-Marin GG, Puerto-Solis M. Identificação de rotavírus associado ao sorotipo G2 em Yucatan, México. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33(6):553-557, 2000.

15. Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 1333-1337, 1994a.
16. Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 32:1338-1340, 1994b.
17. Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Saodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Clinical Microbiology* 16:473-477, 1982.
18. Jain V, Das BK, Bhan MK, Glass RI, Gentsch JR. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infection in India. *Journal of Clinical Microbiology* 39:3524-3529, 2001.
19. Kapikian AZ, Chanock RM. Rotaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, Hirsh MS, Melnick JL, Monath TP (ed) *Virology*, 3<sup>rd</sup> edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p.1657-1708, 1996.
20. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM (ed) *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.1787-1833, 2001.
21. Leite JP, Alfieri AA, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Archives of Virology* 141:2365-2374, 1996.
22. Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JD, Freitas RB, Flewett TH, Beards GM. Epidemiology of rotavirus subgroups and serotypes in Belem, Brazil: a three-year study. *Annales del Institut Pasteur/Virologie* 139:89-99, 1988.
23. Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JD, Freitas RB, Oliveira CS, Bellesi N, Monteiro TA, Lins-Lainson Z, Ramos FL, Valent AS. Immunogenicity, safety and efficacy of rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belém, Brazil. *Bulletin of the World Health Organization* 74:491-500, 1996.

24. Mascarenhas JD, Arias CF, Noriega LP, Lopez S, Gusmão RH, Gabbay YB, Linhares AC. Characterization of Rotavirus strains with unusual electrophoretic profiles. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 92(6):771-774, 1997.
25. Mascarenhas JD, Gusmão RH, Barardi CR, Paiva FL, Simões CO, Gabbay YB, Monteiro TA, Linhares AC. Characterization of rotavirus P genotypes circulating among paediatric inpatients in Northern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 41(3):165-170, 1999.
26. Matsui SM, Offit PA, Vo PT, Mackow ER, Benfield DA, Shaw RD, Padilha-Noriega L, Greenberg HB. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to the heterotypic neutralization domain of VP7 and the VP8 fragment of VP4. *Journal of Clinical Microbiology* 27:780-782, 1989.
27. Mattion NM, Mitchell DB, Both GW, Estes MK. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology* 181:295-304, 1991.
28. Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus. *Emerging Infectious Diseases* 4(4):561-570, 1998.
29. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller AM, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infectious Diseases* 9(5):565-571, 2003.
30. Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP, Candeias JA, Racz ML, Linhares AC, Gabbay YB, Trabulsi JR. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará. *The Journal of Hygiene* 90:117-125, 1983.
31. Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP, Andrade ZP, Castro L. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus. *Journal of Virological Methods* 10:21-28, 1985.

32. Pereira HG, Linhares AC, Candeias JA, Glass RI. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 27:224-233, 1993.
33. Pesavento JB, Estes MK, Prasad BV. Structural organization of the genome in rotavirus. In: Desselberger U, Gray J (ed) *Viral Gastroenteritis*, first edition, v.9, Elsevier Science, Amsterdam, p.115-128, 2003.
34. Rao CD, Gowda K, Reddy BS. Sequence analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotaviruses. *Virology* 276:104-113, 2000.
35. Ray PG, Kelkar SD. Prevalence of neutralizing antibodies against different rotavirus serotypes in children with severe rotavirus-induced diarrhea and their mothers. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* 11(1):186-194, 2004.
36. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Reviews in Medical Virology* 15(1):29-56, 2005.
37. Sattar SA, Ijaz MK, Johnson-Lussenburg CM, Springthorpe VS. Effect of relative humidity on the airborne survival of rotavirus SA11. *Applied and Environmental Microbiology* 47:879-881, 1984.
38. Souza MBLD, Rácz ML, Leite JPG, Soares CMA, Martins RMB, Munford V, Cardoso DDP. Molecular and serological characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Goiânia, Brazil, 1998-2000. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 22:441-443, 2003.
39. Villena C, El-Senousy WM, Abad FX, Pinto RM, Bosch A. Group A Rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: Emergence of unusual genotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 69(7):3919-3923, 2003.

## 4 CONCLUSÕES

- Na amostragem e período analisados, a rotavirose apresentou-se como uma importante infecção causadora de episódios de diarreia aguda em seres humanos encaminhados para a rede de saúde pública do Estado do Paraná, uma vez que, independente da faixa etária, em aproximadamente ¼ dos atendimentos os rotavírus grupo A foram identificados como agente etiológico responsável pela infecção;
- O rotavírus foi encontrado em todos os grupos etários (crianças, adultos, idosos) avaliados, com predominância significativa ( $p < 0,0001$ ) em crianças com até cinco anos de idade;
- A rotavirose mostrou caráter sazonal no Estado do Paraná com aumento significativo ( $p < 0,0001$ ) da frequência nos meses com mais baixos índices de umidade relativa do ar, pluviométrico e temperatura média mínima;
- Os cinco diferentes genótipos G (VP7) e os dois genótipos P (VP4) identificados na amostragem analisada, além do grande número de amostras de rotavírus não-genotipadas, demonstram a grande variabilidade molecular das estirpes de rotavírus grupo A circulantes no Estado do Paraná;
- O genótipo P[8],G1 do rotavírus grupo A foi o mais frequente causador de diarreia aguda e pôde ser encontrado em todos os períodos e regiões incluídos nesse estudo;
- A ocorrência de infecções mistas, caracterizadas pela presença de rotavírus com mais de um G e/ou P genótipo, reforça os dados da literatura que indicam que em países em desenvolvimento a frequência desse tipo de infecção é bem mais evidente do que em países desenvolvidos;

- Na amostragem analisada não foram encontrados genótipos P e G característicos de infecções animais e que poderiam caracterizar infecções heterólogas;
- A ocorrência de casos de diarreia aguda por rotavírus genótipo G9, tanto em infecções singulares quanto em mistas, demonstra, conforme já relatado em outros estudos realizados em escala mundial, a emergência desse genótipo e a necessidade da monitoria periódica de sua prevalência, particularmente considerando-se as futuras campanhas de vacinação.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, A. J.; SPENDLOVE, R. S.; BARNETT, B. B. Aerosol stability of infectious and potentially infectious reovirus particles. *Applied and Environmental Microbiology*, v.44, p.9030-908, 1982.

ALFIERI, A. A. *Padronização de Métodos para caracterização genotípica de Rotavírus grupos A e C de origem humana e animal*. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1996, 352p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). FIOCRUZ - Instituto Oswaldo Cruz.

ALFIERI, A. A. et al. Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe hybridization and sequence. *Archives of Virology*, v.141, p.2353-2364, 1996.

ALFIERI, A. A. et al. Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. *Journal of Virological Methods*, v.83, n.1-2, p.35-43, 1999.

ALFIERI, A. F. *Caracterização dos genótipos P e G de rotavírus do grupo A de origem animal (bovina e suína) e de origem humana pela reação em cadeia pela polimerase*. São Paulo, SP, Brasil, 1999, 134p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

ALTENBURG, B. C.; GRAHAM, D. Y.; ESTES, M. K. Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. *Journal of General Virology*, v.46, p.75-85, 1980.

ARANDA-MICHEL, J.; GIANELLA, R. A. Acute diarrhea: a practical review. *American Journal of Medicine*, v.106, p.670-676, 1999.

ARIAS, C. F. et al. Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s). *Novartis Foundation Symposium*, v.238, p.47-60, discussion p.60-63, 2001.

BACHMANN, P. A. et al. Nomenclature of human rotaviruses: designation of subgroups and serotypes. *Bulletin of the World Health Organization*, v.62, p.501-503, 1984.

BALL, J. M. et al. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*, v.272, p.101-104, 1996.

BEARDS, G. M. et al. A serotype 10 human rotavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, v.30, p.1432-1435, 1992.

BERN, C.; GLASS, R. I. Impact of diarrheal diseases worldwide. In: KAPIKIAN, A. Z. (Ed.). *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*, 2<sup>nd</sup> ed., New York: Marcel Dekker, 1994. p.1-26.

BERNSTEIN, D. et al. Efficacy of live, attenuated, human rotavirus vaccine 89-12 in infants: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, v.654, p.287-290, 1999.

BICAN, P. et al. Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *Journal of Virology*, v.43, p.1113-1117, 1982.

BISHOP, R. F. et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet*, v.2, p.1281-1283, 1973.

BISHOP, R. F. et al. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet*, v.1, p.149-151, 1974.

BISHOP, R. F. Development of candidate rotavirus-vaccines. *Vaccine*, v.11, p.247-254, 1993.

BLACKLOW, N. R.; GREENBERG, H. B. Viral gastroenteritis. *New England Journal of Medicine*, v.325, p.252-264, 1991.

BLOMQUIST, M. et al. Rotavirus infections and development of diabetes-associated autoantibodies during the first 2 years of life. *Clinical and Experimental Immunology*, v.128, n.3, p.511, 2002.

BROWNING, G. F. et al. Rotavirus serotypes G3 predominates in horses. *Journal of Clinical Microbiology*, v.30, p.59-62, 1992.

CARDOSO, D. D. et al. Rotavirus e adenovirus em crianças de 0-5 anos hospitalizadas com ou sem gastroenterite em Goiânia-GO, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v.34, p.433-439, 1992.

CARDOSO, D. D. et al. Epidemiological Features of Rotavirus Infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.98, n.1, p.25-29, 2003.

C.D.C (Centers for Disease Control and Prevention). Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation. *MMWR*, v.48, p.1007, 1999.

CICIRELLO, H. G.; GLASS, R. I. Current concepts of the epidemiology of diarrheal diseases. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, v.5, p.163-167, 1994.

CLARCK, H. F.; OFFIT, P. A. Vaccines for Rotavirus gastroenteritis universally needed for infants. *Pediatric Annals*, v.33, n.8, p.536-543, 2004.

COLUCHI, N. et al. Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of Rotavirus strains in children with acute diarrhea in Paraguay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.5, p.1709-1714, 2002.

CONNER, M. E.; MATSON, D. O.; ESTES, M. K. Rotavirus vaccines and vaccination potential. In: RAMIG, R. F. (Ed.). *Current Topics in Microbiology and Immunology (Rotaviruses)*, 1994, v.185, p.285-337.

COOK, S. M. et al. Global seasonality of rotavirus infections. *Bulletin of the World Health Organization*, v.68, p.171-177, 1990.

COX, M. J. et al. Infection with group C rotavirus in a suburban community in Brazil. *Tropical Medicine and International Health*, v.3, p.891-895, 1998.

CRAUN G. F. Outbreaks of water-borne disease in the United States. *The Journal American of Water WKS ASS*, v.71, p.422-428, 1981.

DESSELBERGER, U. Molecular epidemiology of rotaviruses. In: FARTHING, M. J. G. (Ed.). *Viruses and the gut*. London: Swan, 1989. p.55-69.

ESTES, M. K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiology Review*, v.53, p.410-449, 1989.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). *Fields Virology*, 3<sup>rd</sup> ed., New York: Raven Press, 1996. p.1625-1655.

ESTES, M. K.; MORRIS, A. P. A viral enterotoxin. A new mechanism of virus-induced pathogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.473, p.73-82, 1999.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). *Fields Virology*. 4<sup>th</sup> ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.1747-1785.

FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, H. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*, v.2, p.1497, 1973.

FLEWETT, T.H. et al. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet*, v.2, p.61-63, 1974.

FUKUDOME, K.; YOSHIE, O.; KONNO, T. Comparison of human, simian, and bovine rotaviruses for requirement of sialic acid in hemagglutination and cell adsorption. *Virology*, v.172, p.196-205, 1989.

GABBAY, Y. B. et al. Atypical rotavirus among children living in Belém, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.84, p.5-8, 1989.

GALLEGOS, C.O.; PATTON, J. T. Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology*, v.172, p. 616-627, 1989.

GENTSCH, J. R. et al. Review of G and P typing results from a global collection of strains: Implications for vaccine development. *Journal of Infectious Diseases*, v.174, p.30-36, 1996.

GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R.; SMITH, J. Rotavirus Vaccines: Success by Reassortment? *Science*, v.265, p.1389-1391, 1994.

GOMES, T. A. et al. Enteropathogens associated with diarrheal diseases in urban infants in São Paulo, Brazil. *Journal of Infectious Diseases*, v.164, p.331-337, 1991.

GONZALES, R. A. et al. Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. *Archives of Virology*, v.145, n.9, p.1963-1973, 2000.

GORDON, A. G. Rotavirus infection and the sompe syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, v.146, p.117-118, 1982.

GORZIGLIA, M. et al. Similarity of the outer capsid protein VP4 of the Gottfried strains of porcine rotavirus to that of asymptomatic human rotavirus strains. *Journal of Virology*, v.64, p.414-418, 1990.

GOUVEA, V. et al. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, p.1408-1409, 1994.

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M. C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, p.1333-1337, 1994.

GOUVEA V.; BRANTLY, M. Is rotavirus a population of reassortants? *Trends in Microbiology*, v.3, p.159-162, 1995.

HAFFEJEE, I. E. Neonatal rotavirus infections. *Reviews in Infectious Diseases*, v.13, n.5, p.957-962, 1991.

HARDY, M. E. et al. Comparative amino acid sequence analysis of VP4 for VP7 serotype 6 bovine rotavirus strains NCDV, B641, and UK. *Journal of Virology*, v.65, p.5535-5538, 1991.

HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A. Z. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *Journal of Health, Population and Nutrition*, v.18, p.5-14, 2000.

IMAI, M. et al. Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *Journal of Virology*, v.47, p.125-136, 1983.

ITURRIZA-GÓMARA, M. et al. Rotavirus gastroenteritis and Central Nervous System (CNS) infection: characterization of the VP7 and VP4 genes of Rotavirus strains isolated from paired fecal and cerebrospinal fluid samples from a child with CNS disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.12, p.4797-4799, 2002.

KALJOT, K. T. et al. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *Journal of Virology*, v.62, p.1136-1144, 1988.

KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses, In: FIELDS, B. N. *et al.* (Ed.). *Fields Virology*, 2<sup>nd</sup> ed., New York: Ravens, 1990. p.1353-1404.

KAPIKIAN, A. Z. Jennerian and modified Jennerian approach to vaccination against rotavirus diarrhea in infants and young children: An introduction. In: *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*, 2<sup>nd</sup> ed., New York: Marcel Dekker, Inc., 1994. p.409-417.

KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: FIELDS, B. N *et al.*, (Ed.). *Fields Virology*, 3<sup>rd</sup> ed., vol. 2, New York: Raven Press, 1996. p.1657-708.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). *Fields Virology*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.1787-1833.

KELJO, D. J.; SMITH, A. K. Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells. *Journal Pediatric Gastroenterology Nutritional*, v.7, p.249-256, 1988.

KHAN, S. A.; AHMED, A.; KHALID, S. M. Diarrhea due to rotavirus and probability of sewage contamination. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, v.5, n.2, p.142-144, 1992.

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R. L. The magnitude of the global burden of diarrheal disease from studies published 1992-2000. *Bulletin of the World Health Organization*, v.81, n.3, p.197-204, 2003.

LEITE, J. P. et al. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Archives of Virology*, v.141, p.2365-2374, 1996.

LERNIA, V.; LOMBARDI, M.; SCOCCO, G. Infantile Acute Hemorrhagic Edema and Rotavirus Infection. *Pediatric Dermatology*, v.21, n.5, p.548-550, 2004.

LINHARES, A. C. et al. Duovirus (rotavirus) em Belém do Pará, Brasil (nota prévia). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.19, p.278-279, 1977.

LINHARES, A. C. et al. Acute diarrhoea associated with rotavirus among children living in Belém, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.77, p.384-390, 1983.

LINHARES, A. C. et al. Epidemiology of rotavirus subgroups and serotypes in Belem, Brazil: a three-year study. *Annales Institute Pasteur/Virologie*, v.139, p.89-99, 1988.

LINHARES, A. C. Rotavirus infection in Brazil: Epidemiology, immunity, and potential vaccination. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.1, p.284-293, 1997.

LINHARES, A. C.; BRESEE, J. S. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. *Pan American Journal of Public Health*, v.8, n.5, p.305-330, 2000.

LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Pathogenesis of *Rotavirus* diarrhea. *Microbes and Infection*, v.3, p.1145-1156, 2001.

MARTINES, J.; PHILLIPS, M.; FEACHEM, R. G. Diarrheal diseases. In: JAMILSON, D. T.; MOSLEY, W. H. (Ed.). *Evolving Health Sector Priorities in Developing Countries*. Washington, DC: World Bank, 1991, p.1-49.

MASCARENHAS, J. D. et al. Characterization of rotavirus P genotypes circulating among pediatric patients in northern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.41, p.165-170, 1999.

MATSUMOTO, K. et al. An outbreak of gastroenteritis associated with acute rotavirus infection in schoolchildren. *Journal of Infectious Diseases*, v.160, p.611-615, 1989.



MATTION, N. M. et al. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology*, v.181, p.295-304, 1991.

MAUNULA, L.; SVENSSON, L.; BONSDORFF, C. H. A family outbreak of gastroenteritis caused by group C rotavirus. *Archives of Virology*, v.124, p.269-278, 1992.

McNULTY, M. S.; CURRAN, W. L.; McFERRAN, J. B. The morphogenesis of a cytopathic bovine rotavirus in Madin-Darby bovine kidney cells. *Journal of General Virology*, v.33, n.3, p.503-508, 1976.

MEBUS, C. et al. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. *Nebraska Research Bulletin*, v.233, p.1-16, 1969.

MENEGHETTI, A. C. et al. Incidence of group A rotavirus in urban and rural areas of the city of Londrina-Brazil, from 1995 to 1997. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.44, n.3, p.257-261, 2001.

MOE, K.; SHIRLEY, J. A. The effects of relative humidity and temperature on the survival of human rotavirus in faeces. *Archives of Virology*, v.72, p.179-186, 1982.

MOON, H. W. Pathophysiology of viral diarrhea. In: KAPIKIAN, A. L. (Ed.) *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*, 1994, p.27-52.

MUSALEM, C.; ESPEJO, R. T. Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11. *Journal of General Virology*, v.66, n.12, p.2715-2724, 1985.

NAKAGOMI, O. et al. Molecular identification by RNA-RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotaviruses of feline and canine origin. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28, p.1198-1203, 1990.

NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T. Genetic diversity and similarity among mammalian rotaviruses in relation to interspecies transmission of rotavirus. *Archives of Virology*, v.120, p.43-55, 1991.

PARASHAR, U. D. et al. Rotavirus – Synopses. *Emerging Infectious Diseases*, v.4, p.562-570, 1998.

PARASHAR, U. D. et al. Global illness and Deaths Caused by Rotavirus Disease in Children. *Emerging Infectious Diseases*, v.9, n.5, p.565-571, 2003.

PATTON, J. T.; SPENCER, E. Genome replication and packaging of segmented-double stranded RNA viruses. *Virology*, v.277, p.2147-225, 2000.

PEREIRA, H. G. et al. An atypical rotavirus detected in a child with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.78, p.245-250, 1983.

PEREIRA, H. G. et al. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization*, v.27, p.224-233, 1993.

PEREZ-SCHAEEL, I. et al. Epidemiological features of rotavirus infection in Caradas, Venezuela: implication for rotavirus immunization programs. *Journal of Medical Virology*, v.59, p.520-526, 1999.

PESAVENTO, J. B.; ESTES, M. K.; PRASAD, B. V. V. Structural organization of the genome in rotavirus. In: DESSELBERGER, U.; GRAY, J. (Ed.). *Viral Gastroenteritis*, 1<sup>st</sup> ed., v.9. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. p.115-128.

PORUCHYNSKY, M.; MAASS, D.; ATKINSON, P. Calcium depletion blocks the maturation of rotavirus by altering the oligomerization of virus-encoded proteins in the ER. *The Journal of Cell Biology*, v.144, n.4, p.651-661, 1991.

PRASAD, B. V. V.; CHIU, W. Structure of rotavirus. In: RAMIG, R. F. (Ed.). *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v.185, p.1-27, 1994.

PRASAD, B. V. V.; ESTES, M. K. Molecular basis of rotavirus replication. In: CHIU, W.; BURNETT, R.M.; GARCEA, R.L (Ed.). *Structural biology of viruses*, Oxford University Press, 1997. p.239-268.

RACZ, M. L. et al. Diarrheal diseases in Brazil: clinical features of rotavirus associated gastroenteritis in children. *European Journal Epidemiology*, v.4, p.382-385, 1988.

RAMACHANDRAN, M. et al. Unusual diversity of human rotavirus G and P genotypes in India. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, p.436-439, 1996.

RUIZ, M. C. et al. Cell lines susceptible to infection are permeabilized by cleaved and solubilized outer layer proteins of rotavirus. *Journal of General Virology*, v.78, p.2883-2893, 1997.

RUIZ, M. C; COHEN, J.; MICHELANGELI, F. Role of  $Ca^{2+}$  in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infectious. *Cell calcium*, v.3, p.137-149, 2000.

SAIF, L. J. Nongroup A rotaviruses. In: SAIF, L. J. e THEIL, K. W. (Ed.). *Viral diarrheas of man and animals*, Boca Raton: CRC Press, 1990. p.73-95.

SAIF, L. J. Bovine Rotavirus. In: CASTRO, A. E. e HEUSCHELE, W. P. (Ed.). *Diagnostic Veterinary Virology: a practitioner's guide*, Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1991. p.126-130.

SAIF, L. J.; JIANG, B. Nongroup A rotaviruses of Humans and Animals. In: RAMIG, R. F. (Ed.). *Current Topics in Microbiology and Immunology (Rotaviruses)*, v.185, p.339-371, 1994.

SANTOS, N. et al. Detection of rotavirus G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, p.2727-2729, 1998.

SANTOS, N.; HOSHINO, Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Reviews in Medical Virology*, v.15, n.1, p.29-56, 2005.

SATTAR, S. A. et al. Effect of relative humidity on the airborne survival of rotavirus SA11. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 47, n.4, p.879-881, 1984.

SCHUMACHER, R. F.; FORSTER, J. The CNS symptoms of rotavirus infections under the age of two. *Klinische Padiatrie* , v.211,n.2, p.61-64, 1999.

SILVA, M. L. R.; NAVECA, F. G.; CARVALHO, I. P. Epidemiological aspects of rotavirus infections in Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 5, n.4, p.215-222, 2001.

SOUZA, D. F. et al. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among adults living in Valentim Gentil, São Paulo state, Brazil. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*, v.16, p.59-65, 1998.

SOUZA, M. B. et al. Molecular and Serological Characterization of Group A Rotavirus Isolates Obtained from Hospitalized Children in Goiânia, Brazil, 1998-2000. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v.22, n.7, p.441-443, 2003.

STEWIEN, K. E. et al. Rotavirus associated diarrhea during infancy in the city of S. Luis (MA), Brazil: A two year longitudinal study. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.33, p.459-464, 1991.

STEWIEN, K. E. et al. Viral, bacterial and parasitic pathogens associated with severe diarrhoea in the city of São Paulo, Brazil. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*, v.11, p.148-152, 1993.

STEWIEN, K. E. et al. Serotypes and electropherotypes of human rotavirus detected in the city of São Luis (Ma), Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.27, p.1355-1361, 1994.

TEIXEIRA, J. M. et al. Epidemiology of rotavirus infections in the Federal District, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.24, p.223-230, 1991.

TEIXEIRA, J. M. et al. Human group C rotavirus in children with diarrhea in the Federal District, Brazil, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, n.11, p.1397-1403, 1998.

THEIL, K. W. Group A rotaviruses. In: SAIF, L. J. e THEIL, K. W. (Ed.). *Viral diarrheas of man and animals*, Boca Raton: CRC Press, Inc.1990. p.35-72.

TIMENETSKY, M. C.; SANTOS, N.; GOUVEA, V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, p.2622-2624, 1994.

TIMENETSKY, M. C. et al. A novel human rotavirus serotype with dual G5-G11 specificity. *Journal of General Virology*, v.78, p.1373-1378, 1997.

TSUNEMITSU, H. et al. Isolation, characterization, and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA 104). *Journal of Clinical Microbiology*, v.29, p.2609-2613, 1991.

URASAWA, S. A. et al. Antigenic and genetic analyses of human rotaviruses in Chiang Mai, Thailand: evidence for a close relationship between human and animal rotaviruses. *Journal of Infectious Diseases*, v.166, p.227-234, 1992.

WARD, R. L. et al. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *Journal of Infectious Diseases*, v.154, p.871-880, 1986.

WENTZ, M. J.; PATTON, J. T.; RAMIG R. F. The 3' terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. *Journal of Virology*, v.70, p.7833-7841, 1996.

WILHELMI, I.; ROMAN, E.; SANCHEZ-FANQUIER, A. Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology & Infection*, v.9, n.4, p.247-262, 2003.

WOODE, G. N.; JONES, J.; BRIDGER, J. Levels of colostral antibodies against neonatal calf diarrhea virus. *The Veterinary Record*, v.97, p.148-149, 1975.

ZARATE, S. et al. VP7 mediates the interaction of Rotaviruses with integrin  $\alpha\beta 3$  through a novel integrin-binding site. *Journal of Virology*, v.78, n.20, p.10839-10847, 2004.

## **APÊNDICES**

<b>APÊNDICE 1 - LISTA DE REAGENTES.....</b>	<b>60</b>
<b>APÊNDICE 2 - SOLUÇÕES E TAMPÕES.....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICE 3 - INICIADORES (<i>primers</i>) UTILIZADOS.....</b>	<b>68</b>
<b>APÊNDICE 4 - PROTOCOLO DE TÉCNICAS.....</b>	<b>75</b>
<b>APÊNDICE 5 - DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA.....</b>	<b>80</b>
<b>APÊNDICE 6 - TABELAS E GRÁFICOS.....</b>	<b>84</b>

## **APÊNDICE 1 - LISTA DE REAGENTES**



**APÊNDICE 1 - LISTA DE REAGENTES**

1. Acetona PA (PM 78,13) (Fluka®)
2. Ácido acético PA (PM 60,05) (Artquímica®)
3. Ácido aminoacético (PM 75,07) (Synth®)
4. Ácido clorídrico
5. Ácido bórico (PM 61,83) (Sicalab®)
6. Acrilamida (PM 71,08) (Gibco BRL®)
7. Agar Noble (Difco®)
8. Agarose (Gibco BRLA®)
9. Álcool etílico PA (PM 46,07) (Nuclear®)
10. Azul de bromofenol
11. Bisacrilamida (PM 154,2) (Sigma®)
12. Borohidreto de sódio (PM 37,83) (Sigma®)
13. Brometo de etídio (PM 394,3) (Sigma®)
14. Cloreto de cálcio
15. Cloreto de Magnésio 50mM (Invitrogen®)
16. Cloreto de sódio (PM 58,44) (CALL®)
17. Clorofórmio PA (PM 119,38) ( Dinâmica®)
18. dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 100mM (Gibco BRL®)
19. EDTA dissodium (PM 372,24) (Gibco BRL®)
20. Formaldeído PA (PM 30,03) (Synth®)
21. Hidróxido de sódio (PM 40,00) (Biotec®)
22. Isotiocianato de guanidina (PM 118,16) (Gibco BRL®)
23. Nitrato de prata PA (Symylar®)
24. Oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen®)
25. Padrão de tamanho molecular 50 pb (Invitrogen®)
26. Padrão de tamanho molecular 123 pb (Invitrogen®)
27. PCR buffer 10X (Invitrogen®)
28. Persulfato de amônio PA
29. Platinum® *Taq* DNA Polymerase 5U/μL (Invitrogen®)
30. SDS (dodecil sulfato de sódio)
31. Sílica (PM 60,08) (Sigma®)

32. Sódio fosfato dibásico anidro (PM 141,96)
33. Sulfato de amônio PA (PM 132,14) (Caal®)
34. Superscript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen®)
35. TEMED
36. TRIS (PM 121,14) (Invitrogen®)
37. Triton X-100 (Gibco BRL®)
38. Uréia

## **APÊNDICE 2 – SOLUÇÕES E TAMPÕES**

## APÊNDICE 2 - SOLUÇÕES E TAMPÕES

### Tampão L6

- ✓ 120 g isotiocianato de guanidina (GUSCN)
- ✓ 100 mL Tris-HCl 0,1M pH 6,4
- ✓ 22 mL EDTA 0,2M pH 8,0
- ✓ 2,6 mL Triton X 100

### Tampão L2

- ✓ 120 g isotiocianato de guanidina (GUSCN)
- ✓ 100 mL Tris-HCl 0,1M pH 6,4

### Tampão de corrida para eletroforese em gel de agarose – TBE (Tris –ácido bórico - EDTA) 10 x pH 8,4

- ✓ 107,78 g TRIS (0,89mM)
- ✓ 55,03 g ácido bórico (0,89mM)
- ✓ 7,45 g EDTA (0,02mM)
- ✓ 1 L H<sub>2</sub>O bd q.s.p.

### Tampão de corrida para eletroforese em gel de poliacrilamida

- ✓ 30 g TRIS
- ✓ 14,4 g ácido aminoacético (glicina)
- ✓ 1 L H<sub>2</sub>O bd q.s.p.

### Tampão estabilizador de rotavírus (TRIS/Ca) 10X pH 7,4

- ✓ 12,12g TRIS (0,89mM)
- ✓ 2,2 g cloreto de cálcio (1,5mM)
- ✓ 1 L H<sub>2</sub>O bd q.s.p.

### Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)

- ✓ 25 mL fenol saturado
- ✓ 24 mL clorofórmio
- ✓ 1 mL álcool isoamílico

#### Sílica

- ✓ 60 g sílica
- ✓ 500 mL H<sub>2</sub>O bd q.s.p.
- ✓ Agitar e permanecer em repouso por 24 horas
- ✓ Desprezar 430 mL do sobrenadante por sucção
- ✓ Ressuspender a sílica em 500 mL H<sub>2</sub>O bd q.s.p
- ✓ Permanecer em repouso por 5 horas. Desprezar 400 mL do sobrenadante
- ✓ Adicionar 600 µL de HCL (32% p/v) ajustar pH (pH2,0)
- ✓ Aliquotar e autoclavar

#### Gel de agarose 1,5%

- ✓ 0,75 g agarose
- ✓ 50 mL TBE 1X
- ✓ 15 µL brometo de etídeo (0,5µg/mL)

#### Gel de agarose 2,5%

- ✓ 1,25 g agarose
- ✓ 50 mL TBE 1X
- ✓ 15 µL brometo de etídeo (0,5µg/mL)

#### Lower TRIS pH 8,8

- ✓ 36,34 g TRIS
- ✓ 200 mL q.s.p. H<sub>2</sub>O destilada

#### Upper TRIS pH 6,8

- ✓ 12,12 g TRIS
- ✓ 200 mL q.s.p. H<sub>2</sub>O destilada

#### Solução Acrilamida/Bisacrilamida

- ✓ 1,3 g bisacrilamida
- ✓ 50 g acrilamida
- ✓ 100 mL q.s.p. H<sub>2</sub>O destilada

Solução Fixadora para gel de poliacrilamida

- ✓ 30 mL álcool etílico absoluto
- ✓ 1,5 mL ácido acético
- ✓ 300 mL H<sub>2</sub>O destilada q.s.p

Solução corante para gel de poliacrilamida

- ✓ 0,55 g nitrato de prata
- ✓ 300 mL H<sub>2</sub>O destilada q.s.p

Solução reveladora para gel de poliacrilamida

- ✓ 9 g hidróxido de sódio
- ✓ 2,5 mL formaldeído
- ✓ 300 ml H<sub>2</sub>O destilada q.s.p
- ✓ 0,06 g borohidreto de sódio

Solução stop para gel de poliacrilamida

- ✓ 15 mL ácido acético
- ✓ 300 ml H<sub>2</sub>O destilada q.s.p

Solução conservadora para gel de poliacrilamida

- ✓ 30 mL etanol
- ✓ 300 ml H<sub>2</sub>O destilada q.s.p

Gel inferior (7,5%) para eletroforese em gel de poliacrilamida

- ✓ 5 mL Lower TRIS
- ✓ 3 mL Acril/Bisacril
- ✓ 50 µL TEMED
- ✓ 0,56 mL persulfato de amônio 2%
- ✓ 11,44 mL H<sub>2</sub>O bd

Gel superior (3,5%) para eletroforese em gel de poliacrilamida

- ✓ 2,50 mL Upper TRIS
- ✓ 0,70 mL Acril/Bisacril
- ✓ 50 µL TEMED
- ✓ 0,60 mL persulfato de amônio 2%
- ✓ 6,20 mL H<sub>2</sub>O bd

Tampão de amostra ( eletroforese em gel de poliacrilamida)

- ✓ 6 g uréia
- ✓ 1 mL de 2-mercaptoetanol
- ✓ 0,2 mL azul de bromofenol 1%
- ✓ 2,5 ml solução TRIS HCl 0,5M pH 6,8
- ✓ 6 mL SDS 10% (dodecil sulfato de sódio)
- ✓ 20 mL q.s.p H<sub>2</sub>O bidestilada

### **APÊNDICE 3 - INICIADORES (*primers*) UTILIZADOS**



### APÊNDICE 3 - INICIADORES (*primers*) UTILIZADOS

Seqüências de nucleotídeos iniciadores para a RT-PCR e a genotipagem de rotavírus grupo A

Genótipo	Iniciador	Polaridade	Seqüência (5'-3')	Posição (nt)	Produto (pb)	Protótipo de origem
gene VP7						
G	9con1	( + )	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG	37-56		HuRV-A / Wa <sup>2</sup>
G	9con2	( - )	GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA	941-922	904	HuRV-A / Wa <sup>2</sup>
G1	9T1-1	( - )	TCT TGT CAA AGC AAA TAA TG	195-176	158	HuRV-A / Wa <sup>2</sup>
G2	9T1-2	( - )	GTT AGA AAT GAT TCT CCA CT	281-262	244	HuRV-A / S2 <sup>2</sup>
G3	9T-3P	( - )	GTC CAG TTG CAG TGT TAG C	503-484	466	HuRV-A/ 107E1B <sup>2</sup>
G4	9T-4	( - )	GGG TCG ATG GAA AAT TCT	440-423	403	HuRV-A / STE <sup>2</sup>
G8	HT8	( - )	CGG TTC CGG ATT AGA CAC	273-256	274	HuRV-A / B37 <sup>4</sup>
G9	9T-9B	( - )	TAT AAA GTC CAT TGC AC	147-131	110	HuRV-A / 116E <sup>2</sup>
G10	ET10	( - )	TTC AGC CGT TGC GAC TTC	714-697	715	HuRV-A / B223 <sup>4</sup>
G5	FT-5	( - )	CAT GTA CTC GTT GTT ACG TC	779-760	742	PoRV-A / OSU <sup>4</sup>
G6	DT6	( - )	CTA GTT CCT GTG TAG AAT C	499-481	500	BoRV-A / UK <sup>4</sup>
G11	BT11	( - )	GTC ATC AGC AAT CTG AGT TGC	336-316	337	PoRV-A / YM <sup>4</sup>
gene VP4						
P	4con2	( - )	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	887-868	876	HuRV-A / KU <sup>1</sup>
P	4con3	( + )	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	11 - 32		HuRV-A / KU <sup>1</sup>
P[4]	2T-1	( - )	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	494-474	483	HuRV-A / RV5 <sup>1</sup>
P[6]	3T-1	( - )	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	278-259	267	HuRV-A / 1076 <sup>1</sup>
P[8]	1T-1	( - )	TCT ACT TGG ATA ACG TGC	356-339	345	HuRV-A / KU <sup>1</sup>
P[9]	4T-1	( - )	TGA GAC ATG CAA TTG GAC	402-385	391	HuRV-A / K8 <sup>1</sup>
P[1]	pNCDV	( + )	CGA ACG CGG GGG TGG TAG TTG	269-289	622	BoRV-A / NCDV <sup>3</sup>

<sup>1</sup> GENTSCH et al., 1992 <sup>2</sup> DAS et al., 1994 <sup>3</sup> GOUVEA et al., 1994a <sup>4</sup> GOUVEA et al., 1994b

(1) 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. *Journal of Clinical Microbiology* 30:1365-1373, 1992.

(2) Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, Kumar R, Bhan MK, Glass RI. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Dehli, India. *Journal of Clinical Microbiology* 32:1820-1822, 1994.

(3) Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 1333-1337, 1994a.

(4) Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 32:1338-1340, 1994b.

Diluição dos oligonucleotídeos iniciadores:

✓ 4 con3 (GENTSCH et al., 1992)

Seqüência: 5' TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A 3'

Posição: nt 11- 32 (+)

Concentração:  $56,3 \text{ nmol}$   $56,3 \times 1000 = 56300 \text{ pmol}$   $56300/200 = 281,5 \text{ }\mu\text{L}$

- Solução estoque: ressuspender em 281,5  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)
- Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®).  
Concentração final: 20 pmol.

✓ 4 con2 (GENTSCH et al., 1992)

Seqüência: 5' ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC 3'

Posição: nt. 887-868 (-)

Concentração:  $50,2 \text{ nmol}$   $50,2 \times 1000 = 50200 \text{ pmol}$   $50200/200 = 251 \text{ }\mu\text{L}$

- Solução estoque: ressuspender em 251  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)
- Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®).  
Concentração final: 20 pmol

✓ 2T – 1 (GENTSCH et al., 1992)

Seqüência: 5' CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC 3'

Posição: nt. 494-474 (-)

Concentração:  $48,3 \text{ nmol}$   $48,3 \times 1000 = 48300 \text{ pmol}$   $48300/200 = 241,5 \text{ }\mu\text{L}$

- Solução estoque: ressuspender em 241,5  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)
- Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®).  
Concentração final: 20 pmol

✓ 3T – 1 (GENTSCH et al., 1992)

Seqüência: 5' TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA 3'

Posição: nt. 278-259 (-)

Concentração:  $49,2 \text{ nmol}$   $49,2 \times 1000 = 49200 \text{ pmol}$   $49200/200 = 246 \text{ }\mu\text{L}$

- Solução estoque: ressuspender em 246  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)

- Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®).  
Concentração final: 20 pmol
- ✓ 1T – 1 (GENTSCH et al., 1992)
- Seqüência: 5' TCT ACT TGG ATA ACG TGC 3'
- Posição: nt. 356-339 (-)
- Concentração:  $48,8 \text{ nmol} \times 1000 = 48800 \text{ pmol}$   $48800/200 = 244 \text{ } \mu\text{L}$
- Solução estoque: ressuspender em 244  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)
  - Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®).  
Concentração final: 20 pmol
- ✓ 4T – 1 (GENTSCH et al., 1992)
- Seqüência: 5' TGA GAC ATG CAA TTG GAC 3'
- Posição: nt. 402-385 (-)
- Concentração:  $48,5 \text{ nmol} \times 1000 = 48500 \text{ pmol}$   $48500/200 = 242,5 \text{ } \mu\text{L}$
- Solução estoque: ressuspender em 242,5 $\mu\text{L}$  de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)
  - Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®).  
Concentração final: 20 pmol
- ✓ pNCDV (GOUVEA et al., 1994a)
- Seqüência: 5' CGA ACG CGG GGG TGG TAG TTG 3'
- Posição: nt. .269-289 (+)
- Concentração:  $49,7 \text{ nmol} \times 1000 = 49700 \text{ pmol}$   $49700/200 = 248,5 \text{ } \mu\text{L}$
- Solução estoque: ressuspender em 248,5 $\mu\text{L}$  de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)
  - Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®).  
Concentração final: 20 pmol
- ✓ 9con1 (DAS et al., 1994)
- Seqüência: 5' TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG 3'
- Posição: nt. 37-56 (+)
- Concentração:  $45,7 \text{ nmol} \times 1000 = 45700 \text{ pmol}$   $45700/200 = 228,5 \text{ } \mu\text{L}$
- Solução estoque: ressuspender em 228,5 $\mu\text{L}$  de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)

- Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®).  
Concentração final: 20 pmol
- ✓ 9con2 (GENTSCH et al., 1992)
- Seqüência: 5' GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA3'
- Posição: nt. 941-922 (-)
- Concentração:  $54,5 \text{ nmol} \times 1000 = 54500 \text{ pmol}$   $54500/200 = 272,5 \text{ } \mu\text{L}$
- Solução estoque: ressuspender em 272,5  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)
  - Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®).  
Concentração final: 20 pmol
- ✓ 9T1 - 1 (DAS et al., 1994)
- Seqüência: 5' TCT TGT CAA AGC AAA TAA TG 3'
- Posição: nt. 195-176 (-)
- Concentração:  $50,2 \text{ nmol} \times 1000 = 50200 \text{ pmol}$   $50200/200 = 251 \text{ } \mu\text{L}$
- Solução estoque: ressuspender em 251  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)
  - Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®).  
Concentração final: 20 pmol
- ✓ 9T1 - 2 (DAS et al., 1994)
- Seqüência: 5' GTT AGA AAT GAT TCT CCA CT 3'
- Posição: nt. 281-262 (-)
- Concentração:  $51,2 \text{ nmol} \times 1000 = 51200 \text{ pmol}$   $51200/200 = 256 \text{ } \mu\text{L}$
- Solução estoque: ressuspender em 256  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)
  - Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®).  
Concentração final: 20 pmol
- ✓ 9T – 3P (DAS et al., 1994)
- Seqüência: 5' GTC CAG TTG CAG TGT TAG C 3'
- Posição: nt. 503-484 (-)
- Concentração:  $53,1 \text{ nmol} \times 1000 = 53100 \text{ pmol}$   $53100/200 = 265,5 \text{ } \mu\text{L}$
- Solução estoque: ressuspender em 265,5  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)

- Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®).  
Concentração final: 20 pmol
- ✓ 9T – 4 (DAS et al., 1994)
- Seqüência: 5' GGG TCG ATG GAA AAT TCT 3'
- Posição: nt. 440-423 (-)
- Concentração:  $66,9 \text{ nmol} \times 1000 = 66900 \text{ pmol}$   $66900/200 = 334,5 \text{ } \mu\text{L}$
- Solução estoque: ressuspender em 334,5  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)
  - Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®).  
Concentração final: 20 pmol
- ✓ FT5 (GOUVEA et al., 1994b)
- Seqüência: 5' CAT GTA CTC GTT GTT ACG TC 3'
- Posição: nt 779-760 (-)
- Concentração:  $62,0 \text{ nmol} \times 1000 = 62000 \text{ pmol}$   $62000/200 = 310 \text{ } \mu\text{L}$
- Solução estoque: ressuspender em 310  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)
  - Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®).  
Concentração final: 20 pmol
- ✓ DT6 (GOUVEA et al., 1994b)
- Seqüência: 5' CTA GTT CCT GTG TAG AAT C 3'
- Posição: nt.499-481 (-)
- Concentração:  $52,0 \text{ nmol} \times 1000 = 52000 \text{ pmol}$   $52000/200 = 260 \text{ } \mu\text{L}$
- Solução estoque: ressuspender em 260  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)
  - Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®).  
Concentração final: 20 pmol
- ✓ HT8 (GOUVEA et al., 1994b)
- Seqüência: 5' CGG TTC CGG ATT AGA CAC 3'
- Posição: nt. 273-256 (-)
- Concentração:  $50,1 \text{ nmol} \times 1000 = 50100 \text{ pmol}$   $50100/200 = 250,5 \text{ } \mu\text{L}$
- Solução estoque: ressuspender em 250,5  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)

- Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®)  
Concentração final: 20 pmol
- ✓ 9T – 9B (DAS et al., 1994)
- Seqüência: 5' TAT AAA GTC CAT TGC AC 3'
- Posição: nt. 147-131(-)
- Concentração: 50,3 nmol  $50,3 \times 1000 = 50300$  pmol  $50300/200 = 251,5$   $\mu$ L
- Solução estoque: ressuspender em 251,5 $\mu$ L de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)
  - Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®).  
Concentração final: 20 pmol
- ✓ ET10 (GOUVEA et al., 1994b)
- Seqüência: 5' TTC AGC CGT TGC GAC TTC 3'
- Posição: nt. 714-697 (-)
- Concentração: 55,0 nmol  $55,0 \times 1000 = 55000$  pmol  $55000/200 = 275$   $\mu$ L
- Solução estoque: ressuspender em 275 $\mu$ L de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)
  - Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®).  
Concentração final: 20 pmol
- ✓ BT11 (GOUVEA et al., 1994b)
- Seqüência: 5' GTC ATC AGC AAT CTG AGT TGC 3'
- Posição: nt. 336-316(-)
- Concentração: 47,0 nmol  $47,0 \times 1000 = 47000$  pmol  $47000/200 = 235$   $\mu$ L
- Solução estoque: ressuspender em 235  $\mu$ L de água ultra-pura (MilliQ®) para obter uma solução 10 X [ ] ( 200 pmol)
  - Solução de uso: diluir uma parte do estoque em nove partes de água ultra-pura (MilliQ®).  
Concentração final: 20 pmol

## **APÊNDICE 4 – PROTOCOLO DAS TÉCNICAS**

## APÊNDICE 4 - PROTOCOLO DAS TÉCNICAS

### Suspensões fecais – Extração bruta

1. Pesar 1g de fezes em balança de precisão
2. Adicionar 9ml de tampão TRIS/Ca 1X
3. Se amostras forem muito líquidas usar proporção 1:2
4. Homogeneizar
5. Calibrar tubos
6. Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm
7. Identificar e estocar em frascos a -20°C

### Extração RNA fd Rotavírus (EGPA e genotipagem)

1. Aliquotar 500 µL da suspensão fecal em tubo tipo eppendorf identificado.
2. Adicionar 50 µL de SDS 10%.
3. Homogeneizar
4. Banho-maria 56°C por 20 minutos.
5. Centrifugar
6. Adicionar 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico.
7. Homogeneizar.
8. Banho-maria 56°C por 15 minutos.
9. Homogeneizar.
10. Centrifugar em alta rotação por 10 minutos
11. Recolher sobrenadante em outro tubo tipo eppendorf (não recolher fase intermediária)  
OBS. A extração pode ser interrompida nesta fase, antes de iniciar o protocolo de BOOM et al, 1990.
12. Adicionar 900 µL de L6.
13. Agitar em temperatura ambiente durante 10 minutos.
14. Spin.
15. Adicionar 30 µL de sílica.
16. Homogeneizar
17. Agitar em temperatura ambiente durante 30 minutos (tempo mínimo).
18. Centrifugar por 30 segundos em alta rotação.
19. Desprezar o sobrenadante por inversão em frasco de descarte contendo NaOH.
20. Adicionar 500 µL de L2
21. Homogeneizar.
22. Centrifugar por 30 segundos em alta rotação.
23. Desprezar o sobrenadante por inversão em frasco de descarte contendo NaOH.
24. Repetir passos 20, 21, 22 e 23.
25. Adicionar 1 mL de álcool 70%.
26. Repetir passos 21 e 22.



27. Desprezar sobrenadante em descarte comum.
28. Repetir passos 25,26 e 27.
29. Adicionar 1 mL de acetona.
30. Repetir passos 21, 22 e 27.
31. Secar o pellet de sílica por 20 a 30 minutos.
32. Adicionar 50 µL de água ultra-pura (MilliQ®).
33. Homogeneizar.
34. Banho-maria 56°C por 15 minutos.
35. Homogeneizar.
36. Centrifugar alta rotação por 2 minutos.
37. Recolher sobrenadante em tubos tipo eppendorf de 500 µL.

#### Montagem das placas de eletroforese e aplicação das amostras:

1. Placas de vidro, espaçadores e pente: lavar com água e sabão, secar e limpar com álcool.
2. Montar as duas placas de vidro separadas pelos espaçadores inferiores e laterais.
3. Colocar grampos
4. Selar as extremidades com agar 2%. Aguardar polimerização.
5. Adicionar gel inferior (gel separador) – após seu preparo adicionar imediatamente à placa até próximo da extremidade inferior do pente.
6. Adicionar água sobre o gel para verificar polimerização.
7. Após completa polimerização do gel inferior, retirar água com papel filtro e adicionar o gel superior (gel concentrador).
8. Colocar o pente para formação das canaletas.
9. Aguardar polimerização.
10. Após completa polimerização do gel, fixar cuidadosamente as placas à cuba de eletroforese.
11. Adicionar tampão de corrida nos reservatórios superior e inferior da cuba.
12. Retirar espaçador inferior e o pente.
13. Adicionar amostras nas canaletas – amostras: aliquotar 20µl de amostra de RNA + 10µl de tampão de amostra - em tubo tipo ependorff novo - banho-maria 56°C por 10 a 15 minutos.
14. Após adição de todas as amostras, ligar a fonte da eletroforese e ajustar a corrente (manter em 60V 20mA - aumentar a corrente para 100V).
15. Aguardar a corrida eletroforética até a saída do corante azul de bromofenol do gel.

#### Coloração do gel com Nitrato de Prata (descrição de acordo com Herring et al., 1982)

1. Retirar as placas com o gel da cuba de eletroforese, abrir e retirar os espaçadores, restando somente o gel.
2. Transferir o gel para a solução fixadora por 30 minutos (o gel pode permanecer por mais tempo nesta solução).

3. Acrescentar a solução corante (nitrato de prata). Deixar o gel por 30 minutos nesta solução. Manter sob agitações periódicas.
4. Desprezar o corante, lavar o gel 2 vezes com água destilada.
5. Acrescentar solução reveladora.
6. Manter na solução reveladora até aparecerem bandas.
7. Após visualização das bandas, interromper a revelação pela adição da solução STOP – por 15 minutos (mínimo).
8. Manter o gel em solução conservadora até a secagem e/ou fotografia.

(1) 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. *Journal of Clinical Microbiology* 28(3) 495-503, 1990.

(2) Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Saodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Clinical Microbiology* 16:473-477, 1982.

#### Mix - RT

REAGENTES	VOLUME POR REAÇÃO (1X)
dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 2,5mM	4 µL
10X PCR Buffer	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2 µL
SuperScript II - RT 200U/ µL	0,15 µL
Água DNase/RNase free q.s.p.	20 µL

## Mix PCR

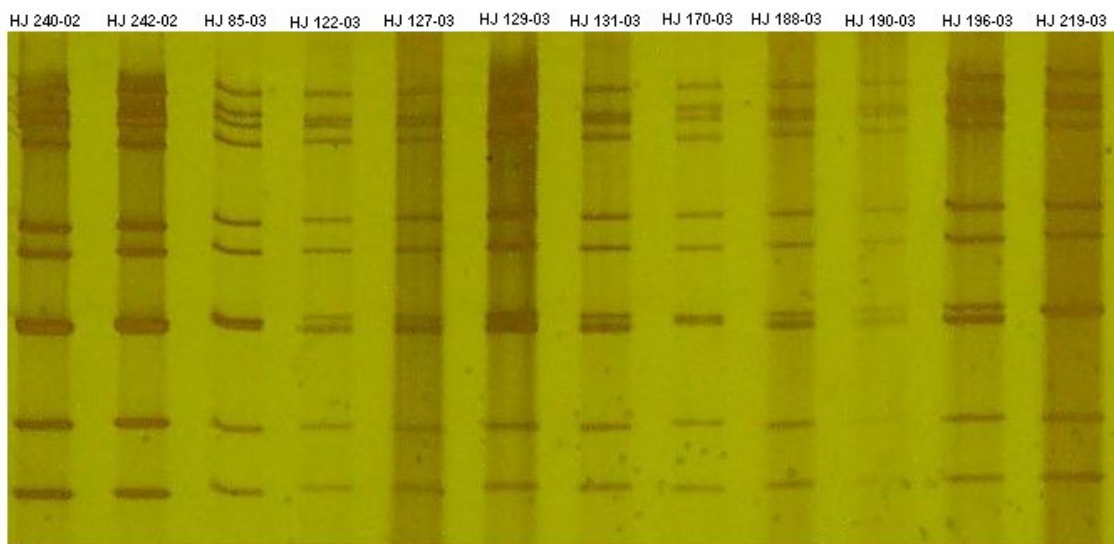
REAGENTES	VOLUME POR REAÇÃO (1X)
dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 2,5mM	4 $\mu$ L
10X PCR Buffer	2,5 $\mu$ L
Platinum Taq DNA Polimerase 5U/ $\mu$ L	0,25 $\mu$ L
Iniciadores consensuais P ou G tipo	1,0 $\mu$ L cada
Água DNase/RNase free q.s.p.	25 $\mu$ L

## Mix Nested - PCR

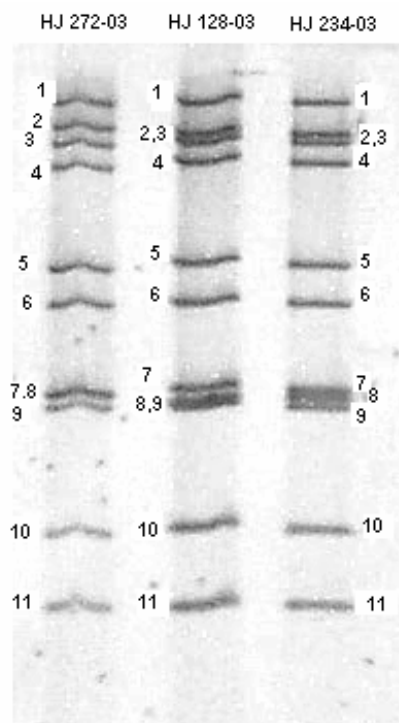
REAGENTES	VOLUME POR REAÇÃO (1X)
dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 2,5mM	4 $\mu$ L
10X PCR Buffer (200mM Tris-HCl 500mMKCl)	2,5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1,0 $\mu$ L
Platinum Taq DNA Polimerase 5U/ $\mu$ L	0,25 $\mu$ L
Iniciadores consensuais P ou G tipo	1,0 $\mu$ L cada
Iniciadores específicos P ou G tipo	1,0 $\mu$ L cada
Água DNase/RNase free q.s.p.	24 $\mu$ L

## **APÊNDICE 5 – DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA**

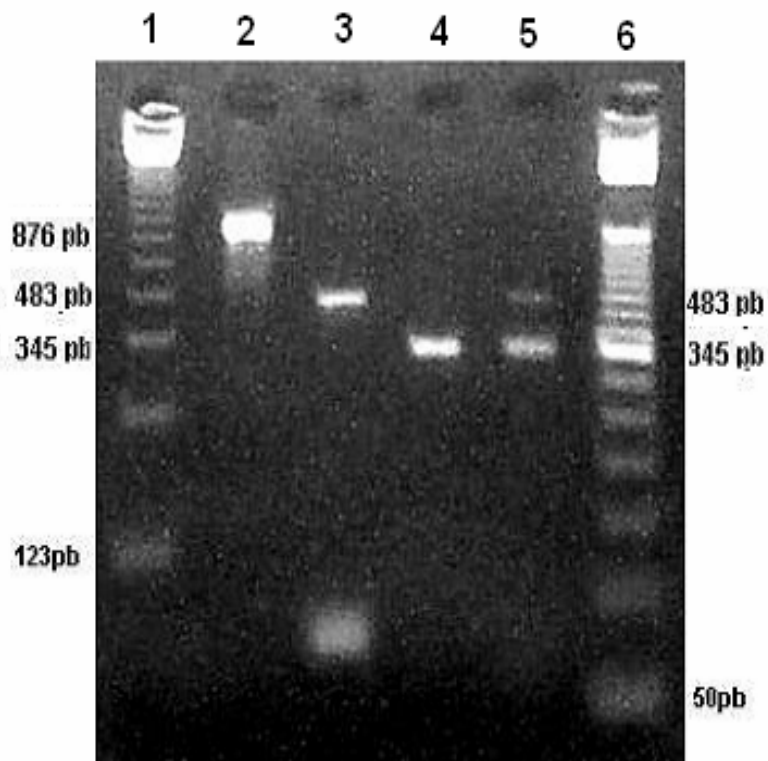
## APÊNDICE 5 - DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA



**Foto 1** – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata, do RNAfd dos rotavírus grupo A humano provenientes de amostras fecais humanas encaminhadas ao LACEN-PR, no período de 2000 a 2003.

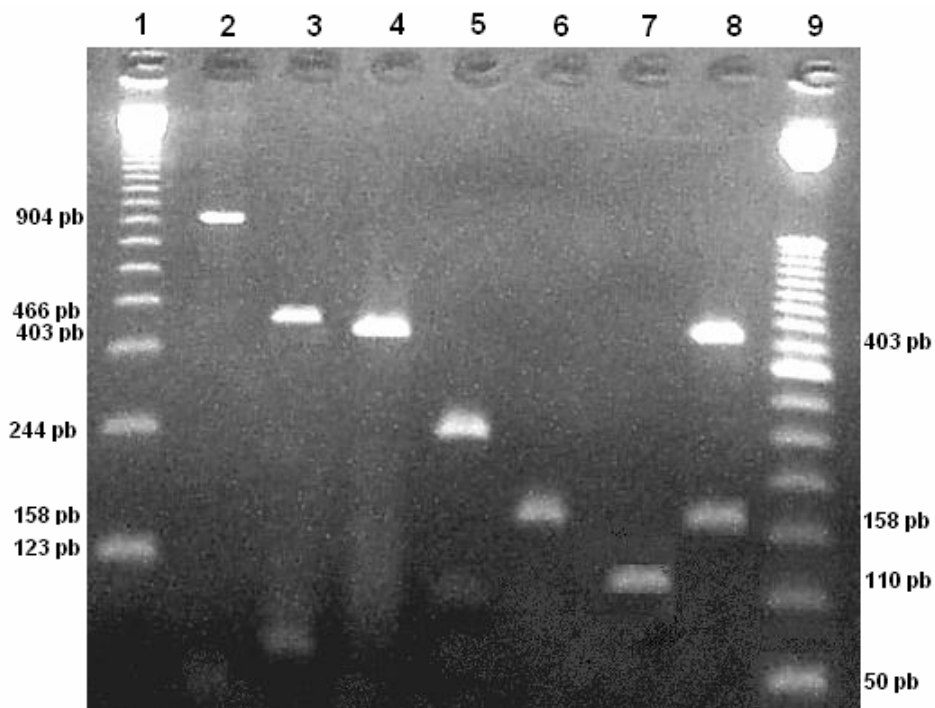


**Foto 2** – Detalhe dos segmentos genômicos de RNAfd de rotavírus grupo A humano, de três amostras fecais, analisadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata.



**Foto 3** – Análise por eletroforese em gel de agarose 2,5 % com brometo de etídeo, dos produtos amplificados pela RT-PCR e N-PCR, de rotavírus grupo A humano provenientes de amostras fecais, para determinação dos genótipos P.

Canaleta 1: marcador de tamanho molecular 123 pb (Invitrogen®, EUA); canaleta 2: produto consensual para genótipo P (876 pb); canaleta 3: genótipo P[4] (483 pb); canaleta 4: genótipo P[8] (345 pb); canaleta 5: infecção mista genótipos P[4] + P[8] (483 pb e 345 pb); canaleta 6: marcador de tamanho molecular 50 pb (Invitrogen®, EUA)



**Foto 4** – Análise por eletroforese em gel de agarose 2,5 % com brometo de etídeo, dos produtos amplificados pela RT-PCR e N-PCR, de rotavírus grupo A humano, provenientes de amostras fecais, para determinação dos genótipos G.

Canaleta 1: marcador de tamanho molecular 123 pb (Invitrogen®, EUA); canaleta 2: produto consensual para genótipo G (904 pb); canaleta 3: genótipo G3 (466 pb); canaleta 4: genótipo G4 (403 pb); canaleta 5: genótipo G2 (244 pb); canaleta 6: genótipo G1 (158 pb); canaleta 7: genótipo G9 (110 pb); canaleta 8: infecção mista genótipos G1 + G4 (158 pb e 403 pb); canaleta 9: marcador de tamanho molecular 50 pb (Invitrogen®, EUA).

## **APÊNDICE 6 – TABELAS E GRÁFICOS**



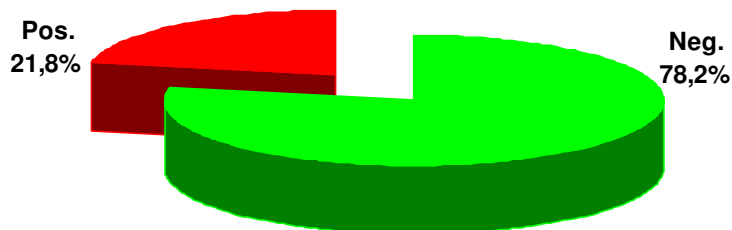
TABELA 3: Distribuição dos casos positivos e negativos para RV gp A pelo EIARA, Estado do Paraná, 2000-2003

Município	Amostras RV gp A		
	Positivas	Negativas	Total
Antonina	-	10	10
Guaratuba	2	-	2
Paranaguá	15	71	86
Curitiba	15	143	158
Almirante Tamandaré	-	1	1
Araucária	-	1	1
Pinhais	-	2	2
São José dos Pinhais	-	2	2
Ponta Grossa	-	4	4
Ipiranga	-	5	5
Imbituva	1	2	3
Prudentópolis	8	1	9
Guarapuava	21	30	51
Turvo	-	2	2
Ivaiporã	1	-	1
Congoinhas	2	1	3
Cornélio Procópio	7	12	19
Santa Mariana	2	1	3
Sertaneja	-	5	5
Londrina	11	15	26
Apucarana	-	2	2
Ibiporã	-	7	7
Cruzeiro do Sul	-	1	1
Alto Paraná	-	4	4
Paranavaí	9	11	20
Nova Aliança do Ivaí	-	1	1
Campo Mourão	-	8	8
Cianorte	-	1	1
Mamboré	-	10	10
Umuarama	4	1	5
Corumbataí do Sul	1	1	2
Formosa do Oeste	3	3	6
Foz do Iguaçu	12	51	63
Cascavel	2	8	10
Pato Branco	-	1	1
Francisco Beltrão	1	3	4
Palmas	-	2	2
União da Vitória	3	1	4
Local não Identificado	-	6	6
<b>Total</b>	<b>120</b>	<b>430</b>	<b>550</b>

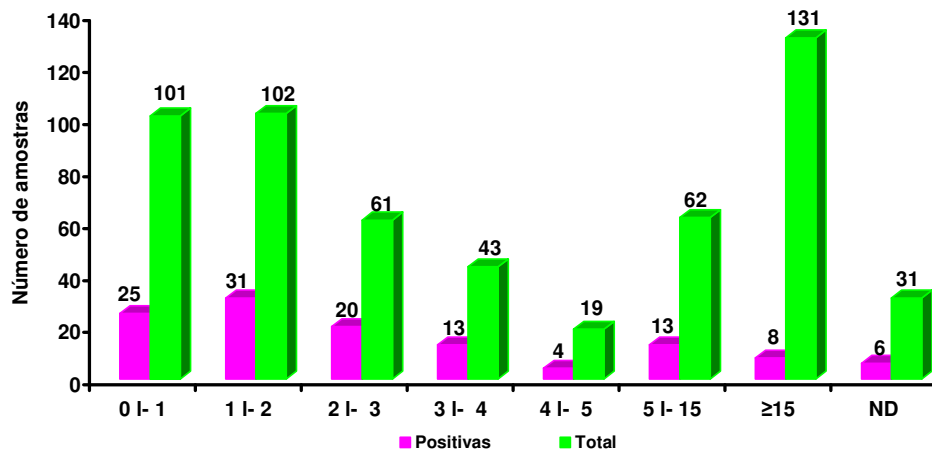
TABELA 4: Resultado da Genotipagem de RV gp A, por *Multiplex Nested* - PCR, e os grupos etários de ocorrência, Estado do Paraná, 2000-2003.

genotipos G e P	Grupo etário (anos)					TOTAL
	0  — 2	2  — 5	5  — 15	≥ 15	ND	
G1 P[8]	26	15	6	3	3	53
G2 P[4]	1	1	-	-	-	2
G3 P[8]	1	-	-	-	-	1
G4 P[8]	3	7	-	-	1	11
G9 P[8]	1	1	1	1	-	4
G1+G4 [P8]	3	-	-	-	1	4
G4+G9 P[8]	-	1	-	-	-	1
G1+G9 P[4]	-	1	-	-	-	1
G1+G2+G4 P[8]	-	-	-	1	-	1
G1+G4+G9 P[8]	1	-	-	-	-	1
G1+G9 P[8]	-	2	-	-	-	2
G1 [P4]+ P[8]	2	1	-	1	-	4
G1 P[?]	-	1	-	-	-	1
G9 P[?]	1	1	1	-	1	4
G? P[4]	-	-	-	1	-	1
G? P[8]	3	1	-	-	-	4
G? P[?]	10	5	3	1	-	19
TOTAL	52	37	11	8	6	114

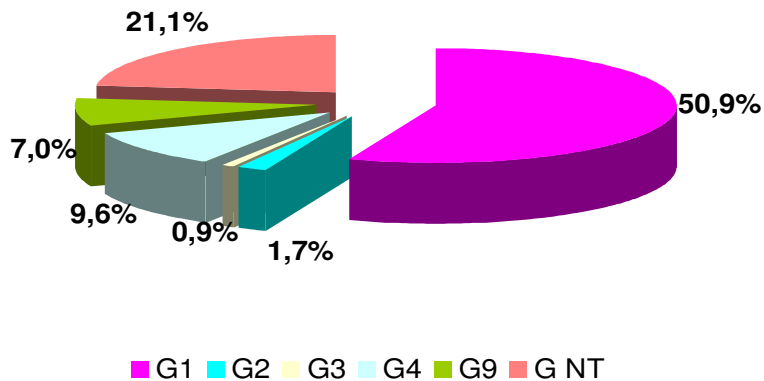
**Gráfico 1. Resultado do diagnóstico para RV gp A por EIARA no Estado do Paraná, 2000-2003.**



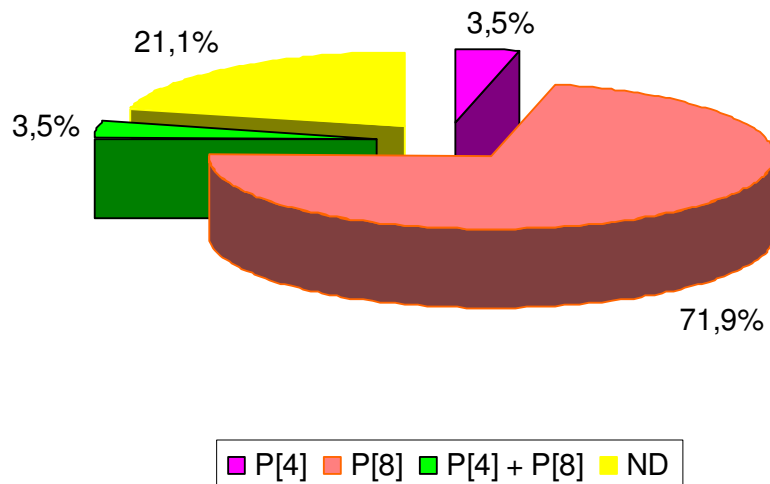
**Gráfico 2. Distribuição, de acordo com o grupo etário, dos casos positivos de RV por EIARA, no Estado do Paraná, 2000-2003.**



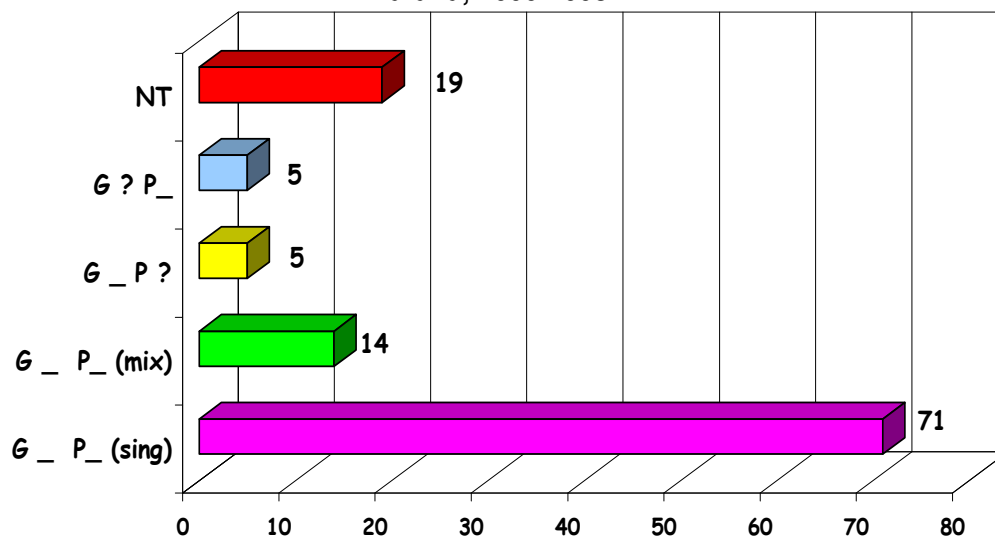
**Gráfico 3. Genótipos G identificados em infecções singulares no Estado do Paraná, 2000-2003.**



**Gráfico 4. Genótipos P identificados em amostras RV gp A positivas, Estado do Paraná, 2000-2003.**



**Gráfico 5. Resultado da genotipagem de RV gp A, Estado do Paraná, 2000-2003.**



**ANEXO - DADOS SIMEPAR: 2000-2003**

**ANEXO - DADOS SIMEPAR: 2000-2003**

Instituto Tecnológico SIMEPAR  
Precipitação Pluviométrica (mm<sup>3</sup>)

Estação: 25134848 Antonina (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Total
2000	307,6	248,3	146,6	39,7	18,3	214,6	63	144,8	226,3	153	371,6	319,7	2253,5
2001	679,4	280,2	228,6	152,3	159,3	130,6	148,1	103	145,1	244,6	194,6	207,6	2673,4
2002	555	250,3	301,6	211	142,3	70,4	64,5	79,5	161	213,1	132	281,7	2462,4
2003	369,6	365,6	235	115,1	47,4	112	156,8	66,1	149,8	167,1	269,3	283,7	2337,5

Estação: 25264916 Curitiba (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Total
2000	171,3	130,1	124,4	8,8	16,2	118,8	73,8	82,1	242,6	154,6	147,8	114,8	1385,3
2001	133	276,2	156,8	63	153,3	127	155,8	53,2	64,1	198	148	96,5	1624,9
2002	217	120,4	84,5	123,1	113,8	39,5	45,4	90,1	173,3	121,8	144,1	154,3	1427,3
2003	147,8	103,8	165,1	64,5	18,6	79,4	120,8	9	129,8	65,4	118,5	153	1175,7

Estação: 25215130 Guarapuava (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Total
2000	168,3	146,1	92,8	88	77,5	162,3	80,1	78,8	305,7	179	191,6	156,8	1727
2001	212,1	259,6	93,1	160,3	161,3	172,3	151,3	153,1	185,6	129,6	159,6	114,1	1952
2002	293,3	85,1	71	136,8	310,6	19,2	65,4	64,5	215,1	257,6	149,1	174,6	1842,3
2003	116,8	172,1	144,6	90,4	63,5	104,5	91,5	43,5	114,1	84,4	209	224	1458,4

Estação: 25135001 Pontas Grossa (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Total
2000	68	165,6	80,5	15,1	44,5	154,8	81,5	77,8	244,8	262	111,5	155,3	1461,4
2001	148,6	273,6	150,8	52,4	135,8	93,8	126,5	65,1	96,4	195,8	121,8	74,1	1534,7
2002	171,6	169,3	107,5	28	121,5	19,2	45,2	57,2	177,1	150,6	195	154,8	1397
2003	112,4	157,3	73,1	105,4	31,2	47,4	116,1	26,2	120	139,8	191,6	193,3	1313,8

Estação: 23185109 Londrina (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Total
2000	170	253,3	235,6	31,7	54	110,4	83	108,5	178,3	77,4	211,3	142,1	1655,6
2001	185	298,6	109,1	123,5	140,3	110,8	46,5	41,4	85,5	42,2	151,1	245,1	1579,1
2002	262,2	95	78,4	3,7	291,6	0,2	77,5	72,1	83,1	69,5	232,8	90,4	1356,5
2003	253,3	114,5	55,5	107,4	38	22,7	74,5	39,7	60,2	79	63,2	164,1	1072,1

Estação: 23275159 Maringá (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Total
2000	94	130,6	34,4	5,1	19,7	33,2	59,7	154,8	141,3	60	149,6	26,2	908,6
2001	133	65,4	87	47,5	156,1	120,8	41,2	69,4	78,4	80,4	117,4	253	1249,6
2002	236,1	90,1	124	13,6	351	1,3	66,4	52,5	114,1	89,5	82,1	152,3	1373
2003	229,8	207,8	146	94,5	71,5	38,5	37,4	64,8	85,5	108	142,6	163,8	1390,2

Estação: 26285158 Palmas (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Total
2000	188,8	173,1	77,8	17	11,3	19	14,1	76,1	408,6	298	100,8	122,8	1507,4
2001	218,3	277,6	200,6	152	150,8	146	117,5	64,1	155,3	266,3	183,6	129,6	2061,7
2002	105,8	63,5	110	73,8	204,3	83,5	146,3	110,1	205,3	282	218,3	163,1	1766
2003	71	111,1	116,8	95,5	63,2	99	77,1	29,6	47,5	12,8	256,3	405,3	1385,2

## Estação: 26075241 Pato Branco (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Total
2000	136,6	165	154,1	126,4	108,1	115,5	127	113,1	251,8	293	131,6	201,6	1923,8
2001	178,6	254,6	100,8	109,1	132,8	175,8	140	67,8	164,6	155,8	195,8	71,1	1746,8
2002	208,6	51,5	139	75,8	293,2	73	95,4	110,8	199	358,6	362,3	192,6	2159,8
2003	95,8	191	125	87	79,8	133,1	75,5	40,4	97,1	189,8	184,6	218,1	1517,2

## Estação: 24535333 Cascavel (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Total
2000	222	112	74	59	59,2	103,8	14,1	36,5	26,7	270,3	410,7	359,7	1748
2001	167	279,2	125,8	103,8	170,1	136,3	86,4	100	196,1	134	182,8	85,4	1766,9
2002	208,6	46,2	84,4	36,2	510	13	76,5	104	131,3	180,6	280,3	211,1	1882,2
2003	153,6	186,8	213,6	115,1	64,5	113,5	131,8	34	147,1	223,3	142,3	230,1	1755,7

## Temperatura Mínima (°C)

## Estação: 25134848 Antonina (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2000	14,8	14,8	16	12,3	6	8,5	3,4	7,5	11,6	13,1	14,5	12,8
2001	16,6	19	17,7	16,2	7,9	4,8	4,4	10,5	5	12,6	13	13,3
2002	16,6	15,8	18	17,2	11,6	9,8	6,1	8,1	3,7	13,8	13,6	15,8
2003	17,8	19	16,7	9,8	5,5	10,3	8,6	4,5	3,4	11,1	11,6	14,3

## Estação: 25264916 Curitiba (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2000	13,1	12,1	13	7,6	1,7	2,2	-2,5	0,6	6,5	11,1	12,3	12
2001	14,6	15,8	15,3	13,8	4,6	1,7	0,3	7,8	2,2	10,5	9,8	9,8
2002	12	13,3	15,3	14,1	9,6	7,8	2,7	4,9	1,3	10,6	10,8	13,1
2003	15,3	17	12,1	6	2,7	7,8	1,8	1,2	2	8,3	9,3	11,6

## Estação: 25215130 Guarapuava (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2000	13,6	11,8	12,1	5,8	-1,3	0,6	-6,0	2	2,5	3,9	10,1	10,1
2001	15,8	16,2	11,8	10,6	0,5	-1,7	-3,2	6,5	-0,3	4,5	10,1	7
2002	12,1	11,6	13,5	13,1	7,6	5,4	0,8	2,5	-2,5	11,1	8,6	13,3
2003	15,1	13,1	12,1	3	-0,5	5	0,6	-2,0	-3,0	8,8	8,3	9,8

## Estação: 25135001 Ponta Grossa (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2000	12,3	11,8	11,3	7	0,1	0,8	-4,0	2,5	5,1	7,6	13,3	10,6
2001	14,6	15,6	15,1	12,3	3,5	0	-1,2	7,6	1,2	7,4	10,6	9,1
2002	11,1	12,8	15,5	13,1	10,3	8	2,5	3,5	-0,4	11,6	10,3	13,8
2003	15,3	15,8	12	3,7	-0,6	3,9	3,4	-1,7	1,8	9,3	8,1	10,5

## Estação: 23185109 Londrina (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2000	15,8	15,1	14,6	10,5	6	6,1	-1,2	6,6	8,6	12	15,6	13,8
2001	17,7	18,5	17,7	15,1	5,8	1,6	3,5	11	5,4	12,6	13,8	12
2002	15	16,1	17,7	16	10,1	10	3,5	8,1	2	0	12,6	17,5
2003	18,5	18,2	15,6	9,8	7	11,1	5,3	5,3	5,1	11,6	11,3	15,1

## Estação: 23275159 Maringá (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2000	17,5	14,3	15,6	11,5	7,3	9,1	0,2	7,1	8,8	12,6	16	13,8
2001	17,7	18,7	18,3	15,6	5,9	2,5	1,7	11	4,8	12,8	15,3	12,6
2002	15,8	17	18	17,3	11,5	11,6	6,3	8,1	3	1,3	11,8	17,7
2003	18,3	18	16,7	9,5	6,9	12,5	5,4	4,6	5	11,6	13,1	15,1

## Estação: 26285158 Palmas (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2000	12,6	10,6	11,6	5,3	-0,4	-0,8	-6,4	0	1,7	2,9	7	9,3
2001	14,8	13,8	10,8	8,3	1,6	-1,7	-2,7	5,5	-2,2	3,7	11,1	7
2002	10,1	10,6	14	11,6	5,8	1,2	1,1	2,4	-3,0	8,3	7,9	12,1
2003	13,6	14,8	10,1	2,4	-1,6	4,5	-2,2	-1,8	-1,7	7,5	7,9	7,4

## Estação: 26075241 Pato Branco (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2000	14,3	13,3	14,1	8,1	3,5	1,7	-4,1	3	4	7,5	8,8	11,6
2001	16,2	17,2	13,1	12,3	4,5	0,6	-1,6	7,3	-0,1	6,5	13,8	9
2002	12,3	13,3	16,6	14,6	8,6	4,4	1,8	4,3	-0,8	0	8,6	15,1
2003	15,1	15	13	5,8	2,5	9,1	1	0,2	0,1	9,5	9,6	10,8

## Estação: 24535333 Cascavel (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2000	16,5	14,1	15	9,8	5,6	6,5	-3,4	5,5	5,4	9,1	11,1	11,6
2001	17,1	18,7	15,3	14,1	3	-0,2	0,1	9,8	2,2	10,3	14,1	10,5
2002	15	12,8	18	15,6	9,1	7,8	3,2	4,8	-0,3	11,3	11	16,7
2003	16,8	15,6	15	7	4,8	12,1	2	1,7	3	11,1	11,6	13,5

## Umidade Relativa Média (%)

## Estação: 25134848 Antonina (Simepar )

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2000	85,7	86,8	87,3	84,1	83,4	85,9	84,3	87,9	90,1	86,4	86,4	84
2001	82,8	88,6	89,6	89,5	90,6	89,3	90,5	91,5	92,5	86,4	91,8	89,9
2002	90,6	89,5	88,7	93,9	91,4	90,4	88,5	88,5	86	87,3	84,8	86,9
2003	88,8	85	87	88,5	86,3	90,7	92,4	88,5	88,8	89,4	84,4	91,3

## Estação: 25264916 Curitiba (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2000	77,9	80,5	80,7	74,3	75,8	75,7	72,5	75,9	83,9	77,5	78,7	75,4
2001	75,9	80,6	78,1	79,4	81,9	79,2	77,6	76,8	79,6	76,5	77,8	76,9
2002	77,6	76	75,7	78,5	82	78,2	79,8	76,3	76	77,5	77,6	78,9
2003	80,5	75,2	79,4	76,9	73,9	80,4	77,8	69,7	76,7	78,7	75,2	79,8

## Estação: 25215130 Guarapuava (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2000	80,1	83,7	82,5	76,6	81,3	80,9	75,9	72	84,6	78,1	81,5	80,3
2001	84,8	88,1	84,1	83,1	85,9	83,9	79,2	74,8	81	78,2	81,1	80,6
2002	81,6	81,3	82	82	87	80,8	82,5	78,9	76,9	84,1	82,3	83
2003	83	85,9	82,6	79,2	79,1	84,9	80,3	71,2	72,6	77,5	76,1	82,9



## Estação: 25135001 Ponta Grossa (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2000	78,7	80,8	80,4	72,2	76,2	74,9	72,9	75,6	83,8	76	78,8	77,8
2001	79,8	84,6	80,2	79	83,2	81,6	78	76,4	79,8	74,8	77,7	76,7
2002	80,1	77,2	78,4	77,5	84,4	77,2	82,9	78,4	75,6	81,7	81,9	84
2003	86,9	84,9	83,2	80	78,6	88,3	88,1	79,2	81,5	82,9	83,8	89,3

## Estação: 23185109 Londrina (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2000	83,7	88,7	87,8	72,4	78,5	81,1	74,8	76,1	83,4	72,4	82,4	82,4
2001	87,2	92,7	87,3	76,1	82	84,2	79	70,9	71,4	67,2	77,4	77,8
2002	82	80,3	75,9	68,6	83,9	77,6	79,4	70	69,1	69,8	79,5	79,4
2003	87	85,8	77	75,8	74,8	82	77,7	66,4	70	74,4	71,6	82,1

## Estação: 23275159 Maringá (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2000	69,4	77,3	74,1	58,7	65,5	65,1	61,6	64,8	72,4	60,8	72,2	73,1
2001	77,1	84,6	77,4	70,6	77,5	76,5	67	58,3	66,4	60,1	72,9	74,5
2002	78	73,6	68,7	58,6	77,1	64,8	68,6	58	61,1	64,6	74,4	73,8
2003	83,6	80,1	72,8	66,9	66,6	68,4	62,3	55,8	60,6	67,2	63,5	74,6

## Estação: 26285158 Palmas (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2000	79,4	81,7	81,7	77,2	80,9	81,4	73,2	69,6	84,2	78,4	77,2	78,2
2001	85,5	87	84,9	84,2	85,7	82,2	79,2	75,8	82,4	77,2	78,8	79
2002	79,8	80,9	82,8	84,7	86,1	84,1	83,7	80,7	77,3	86,9	81	84,4
2003	83	84,8	82,6	78,5	76,7	86,5	80,5	69,6	73	80,3	78,5	84,2

## Estação: 26075241 Pato Branco (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2000	80	83,8	83,9	78,3	83,3	85,2	76	71,7	86	81,3	72,8	73,2
2001	80,5	83,2	78,5	78,7	79,5	77,6	73,2	67,5	71,8	69	72,2	71,4
2002	74,8	75,2	77,1	74,7	80,7	78,7	78,4	74,6	69	78,1	74,9	78,5
2003	76,2	80,3	78	70,8	69,5	81,4	72,5	62,7	65,1	69,4	68,6	75,9

## Estação: 24535333 Cascavel (Simepar)

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2000	80,1	85	84,4	71,6	78,4	83	73,2	72,2	83,8	74,7	75,8	78,4
2001	87,1	91,2	84,9	79,5	84,9	84	76,9	68,6	76,8	66,4	78,2	77,9
2002	80,8	80,3	77,7	69,3	80,9	74,5	75,6	71	65,9	74,8	74,3	78,6
2003	81,2	83,7	77,1	69,9	70	77,9	74,3	64,3	64,6	68,4	66,7	82,3

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)