

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

Núcleo de Doenças Infecciosas

Mestrado em Doenças Infecciosas

Ketene Werneck Saick

**“GENÓTIPOS DE ROTAVIRUS DO GRUPO A DE CRIANÇAS COM
DIARRÉIA AGUDA ATENDIDAS EM DOIS HOSPITAIS DO MUNICÍPIO
DE VITÓRIA – ES, EM PERÍODO ANTERIOR À IMUNIZAÇÃO PARA
ROTAVIRUS”**

Vitória - Espírito Santo

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Ketene Werneck Saick

**“GENÓTIPOS DE ROTAVIRUS DO GRUPO A DE CRIANÇAS COM
DIARRÉIA AGUDA ATENDIDAS EM DOIS HOSPITAIS DO MUNICÍPIO
DE VITÓRIA – ES, EM PERÍODO ANTERIOR À IMUNIZAÇÃO PARA
ROTAVIRUS”**

Dissertação apresentada ao programa de Pós - Graduação em Doenças Infecciosas do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências – Patologia Geral das Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof. Dra. Liliana Cruz Spano

Vitória – Espírito Santo

2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

S132g Saick, Ketene Werneck, 1983-
Genótipos de rotavírus do grupo A de crianças com diarreia aguda
atendidas em dois hospitais do município de Vitória – ES, em período
anterior à imunização para rotavirus / Ketene Werneck Saick. – 2007.
124 f. : il.

Orientadora: Liliana Cruz Spano.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo,
Centro de Ciências da Saúde.

1. Gastroenterite. 2. Crianças. 3. Rotavírus. 4. Reação em cadeia de
polimerase. 5. Genotipagem. I. Spano, Liliana Cruz. II. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 614

Aos meus queridos pais Orlando e Margaret por sonharem junto comigo por esta realização.

AGRADECIMENTOS

- À minha orientadora, Dr^a Liliana Cruz Spano, pela paciência e carinho com que me orientou desde a iniciação científica e pelos incontáveis conhecimentos científicos que compartilhou comigo durante todo esse período;
- Ao coordenador do Mestrado em Doenças Infecciosas, Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, pelo exemplo constante de que o conhecimento é uma grande riqueza;
- Ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite, por permitir uma visita ao seu laboratório que iniciou meu treinamento nas técnicas de detecção viral e pelo apoio científico;
- Ao Sr. Alexandre Madi Fialho, que, em visita ao NDI, me ensinou a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida que permitiu a detecção do ácido nucléico viral;
- À Dr^a Elenice Moreira Lemos e ao Dr Rodrigo Ribeiro Rodrigues por permitirem utilizar seus laboratórios sempre que necessário para realizar ou completar as técnicas utilizadas;
- Ao Dr. Reynaldo Dietze, coordenador do Núcleo de Doenças Infecciosas.
- As técnicas de laboratório Heloisa, Erica e Lia, pela ajuda desde a Iniciação científica e por torcerem por mim;
- À Sra. Fátima Aparecida Pereira, secretária do Curso de Pós-Graduação em Doenças infecciosas, por ajudar em todos os momentos;
- Aos professores do Programa de Pós-Graduação;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), pelo apoio financeiro deste trabalho;
- À amiga Dr^a Ana Daniela de Sadovsky, pela alegria e encorajamento de sempre e que permitiu que eu utilizasse as amostras coletadas por ela;
- Aos amigos Leandro Rua e Rafael Giubert que durante suas iniciações científicas coletaram parte das amostras deste estudo e me auxiliaram nas técnicas de detecção e de genotipagem dos rotavirus, e que, além disso, me presentearam com amizade e carinho;

- À minha querida amiga Christiane Curi Pereira, companheira fiel desde a faculdade e que dividiu comigo os desafios e a alegrias deste mestrado;
- Aos amigos do LABVIR Adriana, Débora, Diego, João Maurício, Luciana, Lorena, Dr^a Rita, Roberta, Rômulo e Ronaldo que participando ou não diretamente desta pesquisa, me proporcionaram momentos muito felizes em um ambiente de trabalho agradável;
- Aos amigos da turma de mestrado, por estarmos juntos nesta jornada,
- A todos os amigos do NDI que ajudaram a tornar meus dias mais leves, com encontros animados no corredor e na cozinha;
- Às minhas irmãs Kemely e Kaliope pela amizade, torcida e confiança e por deixar o computador ser só meu durante o período de escrita da dissertação;
- A todos os amigos e parentes que torceram e oraram por mim, especialmente durante este período;
- A Deus, Pai muito amoroso, que me segurou em seus braços durante toda esta caminhada.

RESUMO

Os rotavírus do grupo A (RVA) são uma das principais causas de diarreia aguda em crianças até cinco anos tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. O virion possui genoma constituído por 11 segmentos de RNA_{df}, contido por um triplo capsídeo concêntrico, cujo padrão de migração após eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) permite a classificação em grupos (A-G) e em perfis longo, curto e super-curto. O capsídeo externo é formado pelas proteínas VP4 e VP7, cujos genes formam a base do sistema de classificação em genótipos P e G, respectivamente. O conhecimento dos genótipos de RVA em uma determinada área geográfica é essencial para o estabelecimento e o monitoramento de estratégias preventivas. Considerando a carência de estudo de genotipagem no Espírito Santo, esta pesquisa se propôs: i) determinar os genótipos de RVA obtidos de crianças com diarreia aguda, residentes na Região Metropolitana de Vitória - ES, provenientes do Pronto Socorro do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (PS-HINSG) (80/253), entre fevereiro de 2003 e junho de 2004 e; ii) determinar a frequência e os genótipos de RVA em crianças atendidas na emergência (n=5) ou hospitalizadas (n=63) na pediatria do Hospital CIAS-UNIMED, entre julho de 2004 e novembro de 2006. RNA_{df} viral foi extraído a partir de suspensão fecal, através do método de guanidina-sílica. EGPA foi realizado nas amostras do CIAS/UNIMED para detecção de RVs e determinação do perfil eletroforético. DNA complementar foi sintetizado por transcrição reversa utilizando o iniciador randômico pdN₆TM. PCR foi realizado utilizando um par de iniciadores consenso para VP4 (4con2/4con3) ou para VP7 (9con1/9con2) e os produtos foram utilizados na Multiplex semi-nested PCR com iniciadores específicos para G e P (G1-G5, G9, P[4], P[6], P[8], P[9]). Das cepas de RVA do PS-HINSG, observou-se os genótipos G1P[8] (83,6%), G9P[8] (7,5%), G1P[4] (2,5%), G1P[6] (1,3%), G4P[6] (1,3%) e G?P[8] (3,8%). Das amostras obtidas no CIAS/UNIMED, 20,6% (14/68) foram positivas para RVA, quatro e dez com perfis curto e longo, respectivamente. Destas cepas, foram observados os genótipos G9P[8] (50%), G2P[4] (28,7%), G2P[8], G1P[8] e G?P[8] (7,1%, cada). Nenhuma infecção mista foi observada em ambos hospitais. Estes dados revelam: i) G1P[8] e G9P[8], genótipos prevalentes no PS-HINSG e no CIAS/UNIMED, respectivamente; ii) G9P[8], detectado no final do período de coleta das amostras do PS-HINSG, sugere flutuação temporal na circulação; iii) G2P[4], encontrado somente em 2006 nas crianças hospitalizadas. Os resultados obtidos sugerem que a vacina Rotarix[®] utilizada no Brasil poderá ser eficiente em reduzir o número de casos e a gravidade da doença na região do estudo. Entretanto, destaca-se o surgimento do genótipo G2 para o qual a vacina apresenta menor proteção, reforçando a necessidade de vigilância contínua dos genótipos circulantes como monitoramento da eficácia da vacina.

ABSTRACT

Group A rotaviruses (RVA) are a major cause of acute diarrhea in children up to 5 years in both developing and developed countries. The virion consists of 11 double-stranded RNA (dsRNA) genome enclosed in a triple-shelled capsid, which migration pattern in polyacrilamide gel eletrophoresis (PAGE) permit the classification in groups (A-G) and in long, short and super-short profiles. The outer shell is composed by VP4 and VP7 proteins which genes form the basis of the classification system in P and G genotypes, respectively. The knowledge about RVA genotypes distribution is essential for the establishment and the monitoring of preventive strategies. Considering the lack of these studies in Espírito Santo State, this investigation proposed: i) to determine RVA genotypes obtained from children with acute diarrhea, resident in Metropolitan region of Vitória - ES, from the Emergency Room at Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG) (80/253), collected between February 2003 and June 2004 and; ii) to determine the frequency and RVA genotypes in children attended at Emergency (n=5) or hospitalized (n=63) from Pediatric Setor of CIAS/UNIMED hospital, between July 2004 and November 2006. dsRNA were extracted from fecal suspensions by guanidine-silica procedure. PAGE was performed in CIAS/UNIMED samples for rotaviruses detection and eletropherotype determination. Complementary DNA was obtained by reverse transcription with pdN₆TM random primer. PCR were done with a pair of consensus primers for VP4 (4con2/4con3) or VP7 (9con1/9con2) and the products were submitted to Multiplex semi-nested PCR with specific primers for the G and P types (G1-G5, G9, P[4], P[6], P[8], P[9]). RVA genotypes observed from HINSG were G1P[8] (83.6%), G9P[8] (7.5%), G1P[4] (2.5%), G1[6] (1.3%), G4P[6] (1.3%) and G?P[8] (3.8%). Among samples stools from CIAS/UNIMED, 20.6% (14/68) were RVA positive, four and ten with short and long eletropherotypes, respectively. The following genotypes were observed: G9P[8] (50%), G2P[4] (28.7%), G2P[8], G1P[8] and G?P[8] (7%, each). No mixed infection was observed in both hospitals. These data reveal: i) G1P[8] and G9P[8] were the most common genotypes from HISNG and CIAS/UNIMED, respectively; ii) G9P[8] was detected in the end of the samples obtainment, suggesting temporal fluctuation on genotype circulation; iii) G2P[4] was found only in 2006 from hospitalized children. The results suggest that RotarixTM vaccine used in Brazil may efficiently reduce the severity and the number of RVA cases in the region studied. However, it must be emphasize the emergence of G2 type for which the vaccine shows lower protection, reforcing the need of continuous surveillance of RVA genotypes as vaccine efficacy monitoring.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (DNA complementar)
CG	Complexo de Golgi
CIAS	Centro Integrado de Assistência à Saúde
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DLP	<i>Double layer particle</i> (partícula com duplo capsídeo)
DMSO	Dimetil-sulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Tri-Fosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
EDTA	<i>Ethylene DiamineTetrAcetic acid</i> (Ácido etilendiamino tetra-acético)
EGPA	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
eIFG4	<i>Translation factor eukaryotic initiation factor G4</i> (Fator G4 eucariótico de início de tradução)
EIE	Ensaio Imunoenzimático
HINSG	Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória
IFN	Interferon
IFR3	<i>Interferon Regulatory 3 Factor</i> (Fator Regulador de Interferon 3)
LABVIR/NDI	Laboratório de Virologia do Núcleo de Doenças Infecciosas
LAGI	Laboratório de Gastroenterite Infecciosa
MET	Microscópio Eletrônico de Transmissão
NDI	Núcleo de Doenças Infecciosas
NSP	<i>Nonstructural Protein</i> (Proteína não estrutural)
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Fase aberta de leitura)

PA	Para Análise
PABP	<i>Poly (A)-Binding Protein</i> (Proteína ligadora de Poli-A)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia pela polimerase)
PNI	Programa Nacional de Imunização
PS	Pronto Socorro
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucléico)
RNA _{df}	RNA de dupla fita
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _{sf}	RNA de simples fita
RVs	Rotavírus
RVA	Rotavírus do grupo A
SUS	Sistema Único de Saúde
snPCR	Semi-nested PCR
TA	Temperatura ambiente
UBS	Unidades Básicas de Saúde
VP	<i>Viral protein</i> (proteína viral)
GAVI	<i>Global Alliance for Vaccines and Immunization</i> (Aliança Global para Vacina e Imunizações)

LISTA DE DIAGRAMAS, FIGURAS, GRÁFICOS, TABELAS E QUADROS

FIGURAS	PÁGINA
Figura 1: Organograma de classificação taxonômica dos RVs segundo Fauquet, ICTV 2005 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/lctv/index.htm)	24
Figura 2: Características estruturais dos RVs.	25
Figura 3: Principais características da estrutura dos genes dos RVs (Adaptado de Estes, 2001).	26
Figura 4: Esquema representativo das principais etapas do ciclo de replicação dos RVs.	31
Figura 5: Distribuição dos casos estudados segundo o município de origem.	46
Figura 6: Representação esquemática dos iniciadores utilizados nas reações de PCR e multiplex snPCR para P.	53
Figura 7: Representação esquemática dos iniciadores utilizados nas reações de PCR e multiplex snPCR para G.	54
Figura 8: EGPA corado pelo método de impregnação pela prata, revelando os 11 segmentos de cepas de RV do grupo A (numeração à direita).	60
Figura 9: RT-PCR para genótipo P.	62
Figura 10: RT-PCR para genótipo G.	63
Figura 11: Multiplex snPCR com genótipos P[8] e P[4].	63
Figura 12: Multiplex snPCR com genótipo P[6].	64
Figura 13: Monoplex snPCR com genótipo G2.	64
Figura 14: Multiplex snPCR com genótipos G1 e G4	65
Figura 15: Multiplex snPCR com genótipos G1 e G9.	65
Figura 16: Mapa representativo dos municípios da Grande Vitória e os respectivos genótipos encontrados.	68
TABELAS	PÁGINA
Tabela 1: Distribuição do número total de casos positivos para RVA, provenientes do PS-HINSG, por faixa etária em meses.	47
Tabela 2: Distribuição do número total de casos positivos para RVA, provenientes do CIAS/UNIMED, por faixa etária em meses.	62
Tabela 3: Distribuição dos genótipos de RVA provenientes do HINSG, de acordo com a faixa etária em meses.	68
Tabela 4: Distribuição dos genótipos G1P[8] e G9P[8], de acordo com os sinais e	69

sintomas apresentados pelos pacientes.

Tabela 5: Distribuição dos genótipos de RVA, provenientes do CIAS/UNIMED, por faixa etária em meses. 71

QUADROS	PÁGINA
Quadro 1: Programa de amplificação utilizado na PCR.	51
Quadro 2: Seqüência dos iniciadores utilizados na PCR	51
Quadro 3: Programa de amplificação utilizado na snPCR	52
Quadro 4: Seqüência dos iniciadores utilizados na snPCR.	52

GRÁFICOS	PÁGINA
Gráfico 1: Mediana de tempo de hospitalização dos pacientes com RVA.	61
Gráfico 2: Freqüências dos genótipos encontrados nas amostras provenientes do PS-HINSG.	66
Gráfico 3: Distribuição dos genótipos de RVA das amostras provenientes do PS-HINSG, por mês de coleta.	67
Gráfico 4: Freqüências dos genótipos encontrados nas amostras provenientes do CIAS/UNIMED.	70
Gráfico 5: Distribuição dos genótipos de RVA das amostras provenientes do CIAS/UNIMED por mês de coleta.	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 HISTÓRICO	22
2.2 TAXONOMIA	23
2.3 VIRUS	24
2.3.1 Aspectos Estruturais	24
2.3.1.1 Capsídeo	24
2.3.1.2 Genoma	25
2.3.1.3 Proteínas estruturais	27
2.3.1.3.1 Do core	27
2.3.1.3.2 Do capsídeo intermediário	27
2.3.1.3.3 Do capsídeo externo	28
2.3.1.4 Proteínas não estruturais (NSP)	28
2.3.1.4.1 NSP1	28
2.3.1.4.2 NSP2, NSP5 e NSP6	29
2.3.1.4.3 NSP3	29
2.3.1.4.4 NSP4	29
2.3.2 Replicação viral	30
2.3.3 Patogênese	31
2.3.4 Classificação	32
2.4 EPIDEMIOLOGIA	34
2.4.1 Transmissão	34
2.4.2 Faixa etária e sazonalidade	34
2.4.3 Distribuição dos genótipos de RVs do Grupo A	35
2.5 DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	36
2.6 ASPECTOS DA RESPOSTA IMUNE	38
2.7 CONTROLE	39
3 OBJETIVOS	42
3.1 GERAL	43
3.2 ESPECÍFICOS	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44

4.1	DESCRIÇÃO DO ESTUDO.....	45
4.2	CASOS E ESPÉCIMES.....	45
	4.2.1 Amostras do Pronto Socorro do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória.....	45
	4.2.2 Amostras do CIAS/UNIMED.....	47
4.3	ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	48
4.4	PREPARO DE SUSPENSÃO FECAL	48
4.5	EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO VIRAL.....	48
4.6	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (EGPA)	49
	4.6.1. Método de impregnação pela prata	49
4.7	RT-PCR E MULTIPLEX SEMI-NESTED PCR.....	49
	4.7.1 Transcrição reversa (RT).....	50
	4.7.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) e multiplex semi-nested PCR (snPCR)	50
	4.7.2.1 PCR	50
	4.7.2.2 Multiplex semi-nested PCR.....	51
	4.7.3 Eletroforese em gel de agarose	53
4.8	SOLUÇÕES E REAGENTES	54
	4.8.1 Tampão para preparo da suspensão fecal.....	54
	4.8.1.1 Tampão Tris-Ca ⁺⁺ pH 7,2	54
	4.8.2 Reagentes para extração.....	54
	4.8.2.1 Sílica.....	54
	4.8.2.2 Tampão L2	55
	4.8.2.3 Tampão L6	55
	4.8.2.4 Etanol 70%	55
	4.8.2.5 Acetona PA.....	55
	4.8.3 Soluções para EGPA.....	55
	4.8.3.1 Tampão Lower-tris 4X pH 8,8.....	55
	4.8.3.2 Tampão Upper-tris 4X pH 6,8.....	55
	4.8.3.3 Persulfato de amônia a 10%.....	55
	4.8.3.4 Acrilamida/Bisacrilamida 50/1,5%.....	56
	4.8.3.5 TEMED (Sigma).....	56
	4.8.3.6 Gel separador 7,5%.....	56
	4.8.3.7 Gel concentrador 4%	56

4.8.3.8 Tampão Tris-Glicina 4X pH 8,2.....	56
4.8.3.9 Solução fixadora	57
4.8.3.10 Solução de nitrato de prata 0,001M.....	57
4.8.3.11 Solução reveladora.....	57
4.8.3.12 Solução de ácido acético 5%.....	57
4.8.3.13 Solução de etanol 10%.....	57
4.8.4 Soluções para gel de agarose.....	57
4.8.4.1 Gel de agarose 1,5%	57
4.8.4.2 Tampão de arrasto (<i>Loading solution</i>)	58
4.8.4.3 Tampão de corrida Tris-Borato-EDTA 10X pH 8,4	58
4.8.4.4 Brometo de Etídio 0,5 µg/mL	58
5 RESULTADOS.....	59
5.1 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	60
5.1.1 Amostras do Pronto Socorro do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória.....	60
5.1.2 Amostras provenientes do CIAS/UNIMED	60
5.1.2.1 Características das amostras provenientes do CIAS/UNIMED	61
5.2 RT-PCR	62
5.3 MULTIPLEX SEMINESTEDPCR	63
5.4 GENÓTIPOS DETECTADOS	66
5.4.1 Amostras do Pronto Socorro do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória.....	66
5.4.1.1. Distribuição dos genótipos.....	66
5.4.1.1.1. <i>Conforme período de coleta dos espécimes.....</i>	<i>66</i>
5.4.1.1.2. <i>Conforme Município de origem dos espécimes</i>	<i>67</i>
5.4.1.1.3 <i>Conforme faixa etária.....</i>	<i>68</i>
5.4.1.1.4 <i>Conforme sinais e sintomas clínicos</i>	<i>69</i>
5.4.2 Amostras provenientes do CIAS/UNIMED	69
5.4.2.1 Distribuição dos genótipos.....	70
5.4.2.1.1 <i>Conforme período de coleta dos espécimes.....</i>	<i>70</i>
5.4.2.1.2 <i>Conforme faixa etária.....</i>	<i>71</i>
6 DISCUSSÃO	72

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	88
7.1 CONCLUSÕES.....	89
7.2 PERSPECTIVAS	90
8 REFERÊNCIAS.....	91
9 ANEXOS	117

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As gastroenterites são uma das principais causas de morbidade e de mortalidade em crianças de até cinco anos de idade em países em desenvolvimento e, também, uma importante causa de morbidade em países desenvolvidos (Santos & Hoshino, 2005).

As diarréias infecciosas podem ser causadas por bactérias, tais como categorias diarreiogênicas de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, todas as espécies de *Shigella*, *Vibrio* spp; por parasitas e por vírus, sendo estes últimos os principais responsáveis e representados em sua maioria pelos *Rotavirus*, *Norovirus*, *Astrovirus* e *Adenovirus* entéricos.

Os rotavírus (RVs) são a causa mais comum de diarréia aguda grave afetando, principalmente, crianças de até três anos de idade. Respondem por 40% das mortes por diarréia em todo o mundo, matando aproximadamente 611.000 crianças por ano, mais de 80% delas nos países em desenvolvimento do sul da Ásia e África subsaariana (Parashar *et al*, 2006). Estima-se que, praticamente todas as crianças, já apresentaram pelo menos um episódio de diarréia por RV até os cinco anos de idade (Glass *et al*, 2006; Parashar *et al*, 2006). Na América Latina, o RV é responsável por 75.000 hospitalizações e 15.000 mortes anuais, com estimativa de custo diário por internação em torno de R\$250,00 (International Rotavirus Symposium, 2004). No Brasil, a freqüência de infecção pelos RVs tem sido descrita entre 8% e 40% (Araújo *et al*, 2002; Luz *et al*, 2005; Santos *et al*, 2005; Carvalho-Costa *et al*, 2006; Volotão *et al*, 2006; Magalhães *et al*, 2007). No município de Vitória/Espírito Santo, a prevalência de RVs encontrada foi de 32,8% em crianças atendidas no Pronto Socorro (PS) do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG) em estudo realizado por este grupo de pesquisa (Sadovsky, 2005) e de 7% em crianças atendidas nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) de São Pedro (Vicentini *et al*, 2004).

Sete grupos de RVs são descritos baseados nas propriedades antigênicas da proteína VP6 do capsídeo intermediário, ou conforme padrão de migração em eletroforese em gel de poliacrilamida. Três grupos causam infecção em humanos (A-C), sendo os RVs do grupo A (RVA) os mais prevalentes no mundo. Os RVA

apresentam genoma segmentado e possuem uma grande diversidade antigênica, recebendo uma classificação binária em sorotipos/genótipos P e G, por sorotipagem através de anticorpos monoclonais ou pela análise dos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7, respectivamente (Estes, 2001). Estas proteínas induzem a produção de anticorpos neutralizantes, gerando resposta protetora homotípica e heterotípica parcial (Brussow *et al*, 1988, 1990; Andrew *et al*, 1992; Ward, 1996; Estes, 2001).

Até o momento, dez genótipos G e 11 genótipos P foram descritos em humanos. As combinações mais comuns entre eles são G1P[8], G2P[4], G3P[8] e G4P[8]. Os genótipos G1-G4 e P[4] e P[8] representam mais de 90% das cepas com importância mundial. O genótipo G9, considerado emergente, também apresenta distribuição mundial e com crescente prevalência; enquanto cepas com G5, G8 e P[6] mostram importância apenas regional (Gentsch *et al*, 2005; Santos & Hoshino, 2005). Estudos recentes têm evidenciado ainda, a detecção do genótipo G12 em diversas partes do mundo assim como no Brasil (Pietruchinski *et al*, 2006; Rahman *et al*, 2007).

Estudos de fase III com a vacina monovalente atenuada G1P[8] Rotarix®(GSK), que faz parte do Programa Nacional de Imunização (PNI) infantil, indicam proteção importante de pelo menos 83% para os genótipos mais comuns, inclusive G9, mas de somente 67% para G2P[4] (Linhares e Villa, 2006; Ruiz-Palacios *et al*, 2006). A ampla diversidade genotípica e antigênica dos RVA e a possibilidade de ocorrerem “reestruturações” (*reassortment*) no genoma entre cepas humanas ou entre cepas humanas e cepas animais, além de mutações, indicam a necessidade de um contínuo monitoramento molecular para que sejam evidenciadas mudanças importantes no padrão epidemiológico de circulação das cepas de RVA, que poderão comprometer a eficácia da imunização.

O perfil das cepas de RVA que circulam no Município de Vitória ou mesmo no Estado do ES é pouco conhecido (Araújo *et al*, 2003). Este estudo permitiu então caracterizar os genótipos de RVA circulantes, causa de diarreia aguda em crianças atendidas no PS do HINSG (fevereiro de 2003 a junho de 2004) e no CIAS-UNIMED (julho de 2004 a novembro de 2006), a maioria delas em período anterior e parte coincidente com o estabelecimento da imunização para este vírus. Desta forma,

contribuiu para o conhecimento do perfil epidemiológico das cepas de RVA da Região Metropolitana de Vitória, Espírito Santo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

As diarréias sempre foram doenças importantes em todo o mundo, entretanto só no século XIX a etiologia infecciosa começou a ser determinada. Até o início dos anos 70, nenhum vírus havia sido confirmado como causa de diarréia aguda e a investigação do agente etiológico era realizada apenas para algumas bactérias e protozoários (*Shigella*, *Salmonella*, *Amoeba*), levando à não identificação da etiologia infecciosa na maioria das vezes. Indícios de que os casos não determinados fossem causados por vírus foram levantados em estudos nos anos 40 e 50 que, demonstraram a transmissão da infecção em voluntários que ingeriram filtrados de suspensão fecal de pacientes com gastroenterite e negativos para bactérias (Parashar & Glass, 2003). Entretanto, a identificação do primeiro agente viral, só ocorreu em 1972, quando o vírus Norwalk, partícula de 27 nm de diâmetro, foi observado através de imunomicroscopia eletrônica em filtrado de suspensão fecal de paciente com gastroenterite (Kapikian *et al*, 1972). No ano seguinte, Bishop *et al* (1973) descreveram as partículas de RVs humanos, com 70 nm, observadas em cortes ultrafinos de biópsias de duodeno de crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda. Pouco depois, Flewett *et al* (1973) e Bishop *et al* (1974) observaram as partículas de RVs em suspensão de fezes de pacientes com gastroenterite. O nome *rotavirus* (do Latim *rota*, que significa roda) foi sugerido com base na morfologia observada ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) onde as partículas assemelham-se a rodas com pequenas espículas na superfície. Além da MET, outros métodos diagnósticos foram posteriormente desenvolvidos (item 2.5) e contribuíram para o conhecimento da importância mundial dos RVs.

No Brasil, os RVs foram descritos pela primeira vez em 1977 em Belém do Pará (Linhares *et al*, 1977) e desde então, uma série de estudos tem demonstrado a importância deste vírus em diarréia aguda infantil em nosso meio (Linhares *et al*, 1989; Pereira *et al*, 1993; Timenetsky *et al*, 1994; Leite *et al*, 1996; Mascarenhas *et al*, 1998; Fernandes *et al*, 2000; Carvalho-Costa *et al*, 2006; Orlandi *et al*, 2006; Magalhães *et al*, 2007).

A importância dos RVs como agente causal de diarreia aguda e o reconhecimento de que a melhoria nas condições de higiene e de saneamento básico não são eficazes para a redução dos casos, indicaram a necessidade do desenvolvimento de vacinas anti-RVs como estratégia preventiva. Desde então, diversos estudos vem sendo desenvolvidos (Vesikari *et al*, 1984; Kapikian *et al*, 1996) e culminaram em duas vacinas atualmente licenciadas para uso (Item 2.7) (Clark *et al*, 1996, 2004; Bernstein *et al*, 1999; Salinas *et al*, 2005; Ruiz-Palacios *et al*, 2006).

2.2 TAXONOMIA

Os RVs pertencem ao gênero *Rotavirus*, classificado na família *Reoviridae*, que é constituída por nove gêneros (Figura 1). O gênero *Rotavirus* é dividido sorologicamente em sete grupos denominados de A-G. Os grupos A, B e C têm sido encontrados tanto em humanos quanto em animais, enquanto que os grupos D-G foram identificados, até o momento, em animais. Os RVA são epidemiologicamente os mais importantes, sendo os principais responsáveis pelos episódios de diarreia aguda em crianças em todo o mundo (Glass *et al*, 2006). No grupo B estão os RVs associados a epidemias primeiramente descritas na China (Hung *et al*, 1984) e, mais recentemente, a casos de diarreia em adultos na Índia e em Bangladesh e a casos esporádicos em crianças também na Índia (Sanekata *et al*, 2003; Ahmed *et al*, 2004; Barman *et al*, 2006). Os RVs de grupo C, que são responsáveis por casos esporádicos e surtos de diarreia, especialmente em crianças maiores de três anos e adultos (Von Bonsdorf *et al*, 1988; Kuzuya *et al*, 1998; Nilsson *et al*, 2000), foram descritos inicialmente em porcos em 1980 (Saif, *et al*, 1980) e posteriormente em humanos (Rodger *et al*, 1982). Este grupo de RVs vêm sendo descrito em diversos países como Brasil, Japão, Eslovênia, Bangladesh e Espanha (Pereira *et al*, 1983, Gabbay *et al*, 1989; Teixeira *et al*, 1998; Kuzuya *et al*, 1998; Rahman *et al*, 2005; Iizuka *et al*, 2006; Steyer *et al*, 2006; Abid *et al*, 2007).

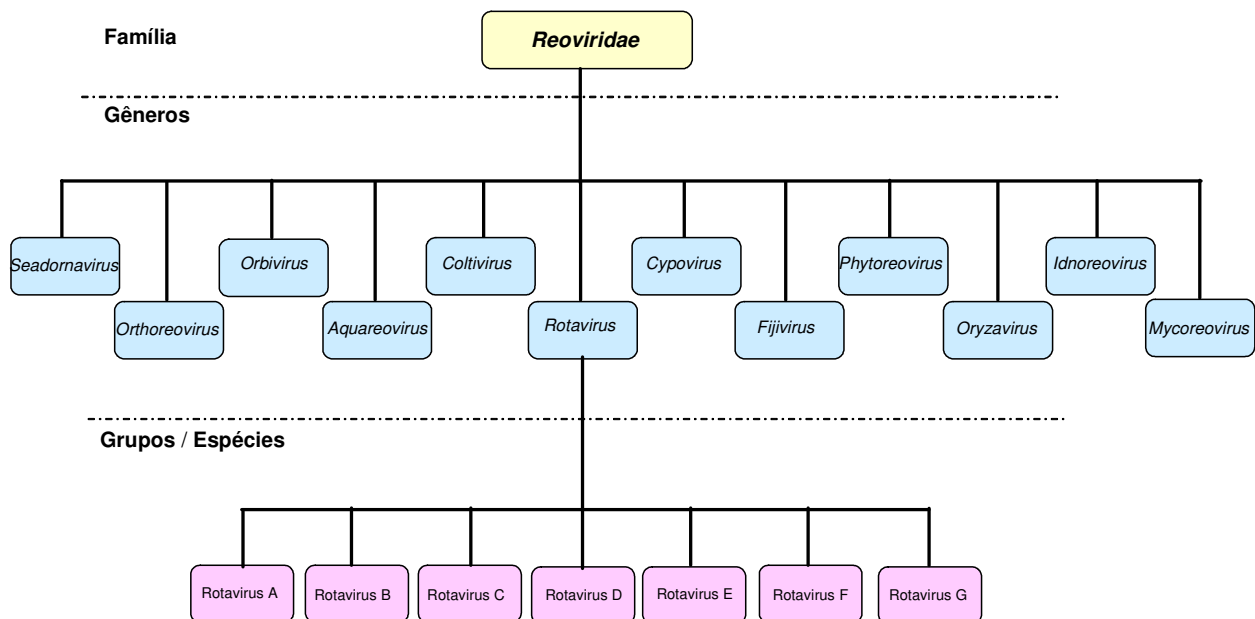


Figura 1: Organograma de classificação taxonômica dos RVs (Fauquet, ICTV 2005 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>)

2.3 VIRUS

2.3.1 Aspectos Estruturais

2.3.1.1 Capsídeo

O virion possui simetria icosaédrica, com cerca de 100 nm de diâmetro, é não-envelopado e constituído por três capsídeos protéicos concêntricos (Figura 2). O capsídeo interno é constituído por 120 moléculas da proteína VP2 organizadas em 60 dímeros que circundam o RNA_{df}. A camada de VP2, por sua vez, é rodeada pelo capsídeo intermediário, constituído por 780 moléculas da proteína VP6 organizadas em 260 trímeros (Figura 2). A proteína VP6 parece ser a principal responsável pela integridade estrutural do capsídeo dos RVs (Zeng *et al*, 1996). O capsídeo externo é constituído por 780 moléculas da glicoproteína VP7, organizada em trímeros que interagem com os trímeros de VP6; e por espículas formadas pela proteína VP4.

Essas espículas interagem tanto com a proteína VP7 quanto com a proteína VP6 do capsídeo intermediário (Crawford *et al*, 1994).

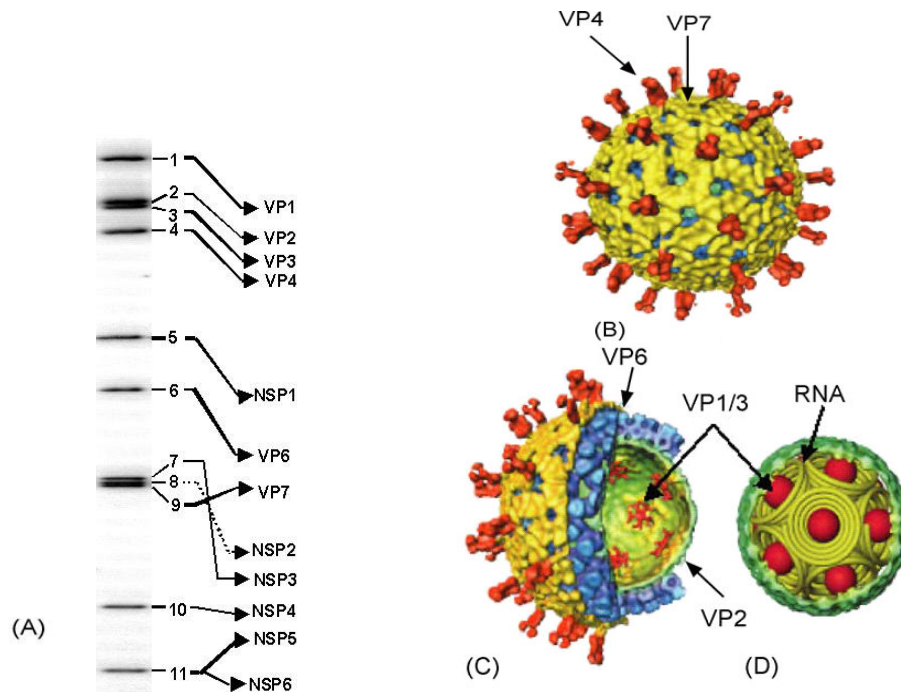


Figura 2: Características estruturais dos RVs. (A) EGPA mostrando os 11 segmentos de RNAdf que formam o genoma do vírus. Os segmentos genômicos estão numerados à direita e as proteínas codificadas por cada gene estão indicadas pelas setas. (B) Reconstrução por Crio-Microscopia Eletrônica da partícula de triplo capsídeo dos RVs. A espícula VP4 está demonstrada em vermelho e a camada externa composta por VP7, em amarelo. (C) Partícula de triplo capsídeo em corte, demonstrando as camadas intermediária (VP6, em azul) e interna (VP2, em verde) e os complexos transcripcionais (VP1/VP3) em vermelho. (D) Organização esquemática do genoma dos RVs. Cada segmento de RNAdf é mostrado como um espiral em forma de cone invertido, em amarelo, circundando os complexos de VP1/VP3 dentro da camada VP2, em verde (Adaptado de Jayaram *et al*, 2004).

2.3.1.2 Genoma

O genoma viral é formado por 11 segmentos lineares de RNA de dupla fita (RNAdf) contidos pelo capsídeo interno (Figura 2). Na ausência de proteínas virais, as moléculas de RNAdf não são infecciosas, refletindo o fato de que as partículas virais contêm sua própria RNA polimerase dependente de RNA, necessária para a transcrição dos segmentos de RNA em RNAm ativos. Cada segmento do genoma apresenta uma guanina na extremidade 5' seguida de uma região não codificadora, composta de nucleotídeos conservados. Na seqüência, existe a fase aberta de

leitura (ORF), que corresponde à proteína codificada pelo gene, e outra seqüência conservada não codificadora com uma citidina na extremidade 3' (Figura 3), (Estes, 2001).

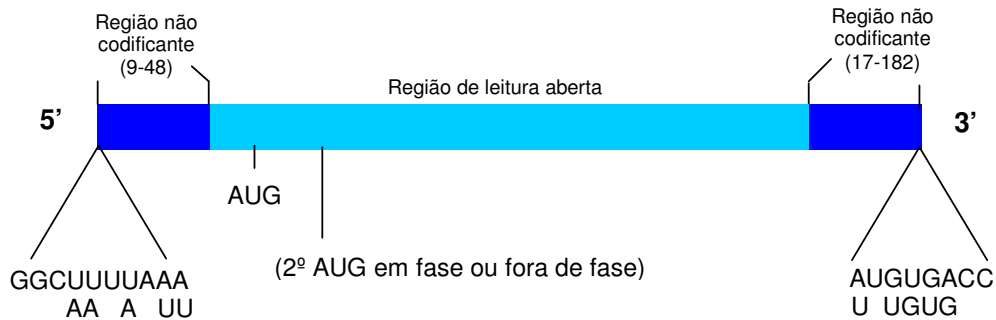


Figura 3: Principais características da estrutura dos genes dos RVs (Adaptado de Estes, 2001).

O tamanho dos segmentos varia de 667 a 3.302 pares de bases (pb) e são visualizados em EGPA de acordo com seus tamanhos, sendo numerados em ordem de migração, com o fragmento menor chamado de segmento um (Figura 2). O padrão de migração observado pode ser utilizado para classificar as cepas de RVs em grupos. Os segmentos dos RVA apresentam quatros grupos de migração distintos: um grupo com os quatro segmentos mais pesados, dois grupos formados pelos cinco segmentos de peso intermediário (dois e três segmentos) e um grupo com os dois mais leves. Estes dois últimos segmentos também são utilizados para classificar os RVA em perfis de migração, como: i) curto, quando o segmento 11 migra mais vagarosamente do que o usual e fica localizado entre os segmentos nove e dez; ii) super curto, quando a migração é ainda mais lenta que a do perfil curto e; iii) longo, perfil mais usual (Estes, 2001). Quando o perfil de migração típico dos RVA não é observado, a cepa estudada pode pertencer a outro grupo de RVs, a uma cepa aviária de RVA ou então, uma cepa de RVA que sofreu rearranjos.

Fenômenos de rearranjo são descritos em segmentos do genoma do RVA, através do aumento do número de pares de bases de um segmento por concatamerização, ou por redução do número de pares de bases por deleção (Tian *et al*, 1993). A ocorrência deste fenômeno no segmento 11, explicaria os perfis curto, super-curto e

longo, descritos anteriormente para os RVA. Os RVA podem ainda sofrer “reestruturações” (*reassortment*), dado à natureza segmentada do genoma, onde troca dos segmentos gênicos entre cepas diferentes que infectam uma mesma célula ocorre durante uma infecção mista (Estes, 2001). Os 11 segmentos gênicos codificam 12 proteínas – seis estruturais e seis não estruturais (Figura 2).

2.3.1.3 Proteínas estruturais

2.3.1.3.1 *Do core*

As proteínas que formam o *core* (VP1, VP2 e VP3), codificadas pelos segmentos um, dois e três (Figura 2), respectivamente, são proteínas estruturais que possuem afinidade por RNA. Cada uma das proteínas está envolvida nos processos de transcrição e replicação (Zeng *et al*, 1996). Vários achados indicam que a proteína VP1 é a RNA polimerase viral e atua tanto como transcriptase como replicase (Cohen *et al*, 1989; Poch *et al*, 1989; Valenzuela *et al*, 1991; Patton *et al*, 1996). A proteína VP2 se liga de forma não específica ao RNA (Boyle *et al*, 1986; Labbe *et al*, 1994; Lawton *et al*, 1997a). A proteína VP3 é a menos conhecida e atua como guanilil e metiltransferase (Pizarro *et al*, 1991; Liu *et al*, 1992). As proteínas VP1 e VP3 se unem formando um complexo que se liga a cada segmento de RNA (Figura 2) (Prasad *et al*, 1996; Pesavento *et al*, 2001).

2.3.1.3.2 *Do capsídeo intermediário*

A proteína VP6 é codificada pelo segmento seis (Figura 2). É a principal componente estrutural da partícula dos RVs, correspondendo a 51% da massa total de proteínas e possui papel fundamental na estrutura da partícula, uma vez que interage tanto com as proteínas do capsídeo externo (VP4 e VP7) quanto com a proteína VP2 do core. Estas características permitem a utilização da proteína VP6 como principal alvo nos testes diagnósticos (Estes, 2001). A proteína VP6 induz a produção de grande quantidade de anticorpos, porém não são anticorpos neutralizantes (Burns *et al*, 1996).

2.3.1.3.3 Do capsídeo externo

A glicoproteína VP7 é codificada pelos segmentos sete, oito ou nove (Figura 2). É a segunda proteína mais abundante na partícula e junto com a proteína VP4 forma o capsídeo externo.

A proteína VP4, que é codificada pelo segmento quatro, não é glicosilada e forma a espícula encontrada no capsídeo externo (Figura 2). É responsável pela adsorção do vírus na célula (Crawford *et al*, 1994) e tem função de hemaglutinina (Kalica *et al*, 1983). A clivagem desta proteína (protease sensível) em VP5* (massa molecular de 60 KDa) e VP8* (28 KDa) – que permanecem associados à partícula - resulta em aumento da infecciosidade viral e da penetração do vírus na célula (Clark *et al*, 1981; Espejo *et al*, 1981; Estes *et al*, 1981; Kaljot *et al*, 1988).

Tanto VP7 como VP4 induzem a produção de anticorpos neutralizantes gerando imunidade protetora (Greenberg *et al*, 1983; Hoshino *et al*, 1985; Svensson *et al*, 1987; Shaw *et al*, 1987) e servem de base para o sistema binário de classificação dos RVA.

2.3.1.4 Proteínas não estruturais (NSP)

O genoma dos RVs codifica seis proteínas não-estruturais (NSP – *nonstructural proteins*), denominadas NSP1-NSP6 (Figura 2), que estão envolvidas na replicação viral e na patogênese da infecção. Todas as proteínas não-estruturais, exceto a NSP4, interagem de alguma maneira com o ácido nucléico.

2.3.1.4.1 NSP1

NSP1 se acumula no citoplasma das células infectadas pelo RV. Não é uma proteína essencial para a replicação viral, porém é um importante fator de virulência, uma vez que atua como moduladora da resposta imune inata, através de sua ação antagonista da via de sinalização de interferon (IFN), por degradar o fator regulador de interferon 3 (IFR3) que atua como indutor de IFN (Barro *et al*, 2005).

2.3.1.4.2 NSP2, NSP5 e NSP6

NSP2 é uma NTPase que interage com a RNA polimerase (VP1) (Schuck *et al*, 2001) e com NSP5, que por sua vez, se associa com NSP6 possivelmente formando um complexo protéico regulador da replicação. Tem sido mostrado que NSP2 e NSP5 interagem na formação do viroplasma (Eichwald *et al*, 2004). NSP6 é codificada por um ORF alternativo do segmento 11, interage com NSP5 e se acumula no viroplasma (Mattion *et al*, 1991; Torres-Vega *et al*, 2000).

2.3.1.4.3 NSP3

NSP3 tem papel importante na virulência dos RVs, pois modula a síntese protéica na célula desviando a maquinaria para a síntese das proteínas virais. A NSP3 reduz a síntese das proteínas celulares, porque compete com o PABP (*poly-A binding protein*) pela ligação com o eIFG4 (*Translation factor eukaryotic initiation factor G4*) proteína NSP3 também tem a propriedade de se ligar ao RNAm viral e essa ligação parece impedir a sua degradação e/ou manter um *pool* de RNAm virais viáveis para a tradução (Montero *et al*, 2006).

2.3.1.4.4 NSP4

NSP4, única proteína não-estrutural que não se liga ao RNA, é uma glicoproteína com múltiplos domínios que atua na morfogênese viral e como enterotoxina (Ball *et al*, 1996; Lopez *et al*, 2005; Jagannath *et al*, 2006). O seu papel na morfogênese viral se dá por participar como receptor para as partículas de duplo capsídeo (DLPs) formadas no viroplasma, permitindo que essas partículas brotem para dentro do RE onde continuarão o seu processo de maturação (Taylor *et al*, 1996; Taylor & Bellamy, 2003).

Em 1996 foi descrito o seu papel como enterotoxina (Ball *et al*, 1996), função importante no desenvolvimento da diarreia, especialmente antes do desenvolvimento de lesão histopatológica. A NSP4 altera as vias de transdução de sinal mobilizando cálcio intracelular e aumentando a secreção de cloreto, levando a diarreia secretora (Ball *et al*, 1996).

2.3.2 Replicação viral

A entrada dos RVs na célula é um processo com muitas etapas e que envolve o reconhecimento de receptores e co-receptores celulares e clivagem proteolítica de proteína viral (Mendez *et al.*, 1999). A proteína VP4 e/ou os seus fragmentos (VP5* e VP8*) medeiam a ligação do vírus à célula. O processo inicial de adsorção envolve receptores que interagem com VP8* e os passos seguintes, envolvem integrinas que interagem com VP5* (Figura 4) (Coulson *et al.*, 1997; Hewish *et al.*, 2000).

O papel preciso de VP7 durante as interações iniciais com a célula ainda não está claro, mas parece modular a função de VP4 durante os processos de adsorção e de penetração e interagir com moléculas da superfície depois que a interação é iniciada por VP4 (Mendez *et al.*, 1996, 1999).

Logo após a penetração da partícula no citoplasma, a baixa concentração de Ca^{2+} presente leva à dissociação dos trómeros de VP7 e a conseqüente destruição do capsídeo externo (Figura 4). Esse desnudamento é um evento necessário para o início da transcrição viral uma vez que expõe a partícula de duplo capsídeo que é transcricionalmente ativa (Sandino *et al.*, 1986; Lawton *et al.*, 1997b; Jayaram *et al.*, 2004). Os RNAm transcritos deixam a partícula de duplo capsídeo através de canais tipo I existentes na camada VP2 (Lawton *et al.*, 1997b).

Os processos de transcrição, de tradução, de replicação e de empacotamento do RNAdf genômico ocorrem em uma região eletrodensa do citoplasma, adjacente ao RE, chamada de viroplasma (Figura 4) (Petrie *et al.*, 1982; 1984). Para a replicação e encapsidação do genoma, inicialmente ocorre a formação de um pré-*core* de replicação intermediário composto de VP1, VP3, NSP2, NSP3 e NSP5. Os RNAm se associam a este pré-*core* e são utilizados como moldes para a síntese dos 11 segmentos de fita negativa, os quais vão compor o RNAdf genômico (Chen *et al.*, 1994).

Após a encapsidação do RNAdf no pré-*core* ocorre a adição seqüencial de VP2 e de VP6 formando a DLP (Estes, 2001; Patton *et al.*, 2004). Esta partícula se liga à NSP4 presente na membrana do RE e brota para dentro desta organela. Ao brotar ganha um envelope transitório que é perdido assim que a proteína VP7 é adicionada à partícula (Figura 4). A adição de VP4 ocorre fora do RE e parece utilizar os “*lipid rafts*” que carregam esta proteína (Delmas *et al.*, 2004). As partículas completas

deixam a célula infectada por um processo de transporte vesicular não convencional que não utiliza o CG, antes que ocorra a lise celular (Figura 4), (Jourdan *et al*, 1997).

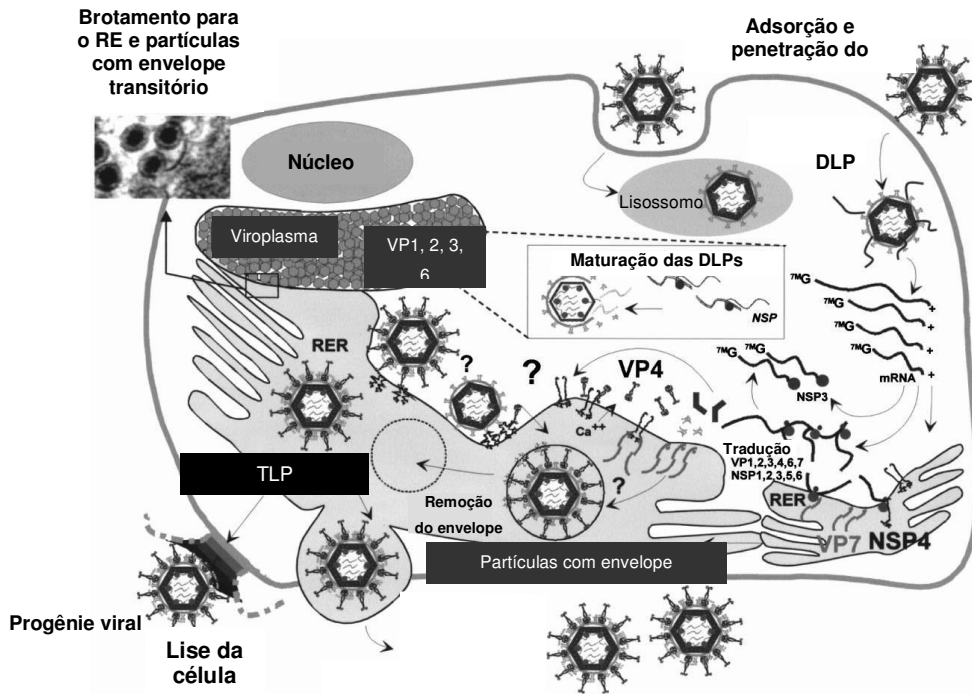


Figura 4: Esquema representativo das principais etapas do ciclo de replicação dos RVs. O viroplasma é o local de síntese das DLPs, após formadas, estas partículas se ligam a NSP4 presente na membrana do RE e brotam para dentro desta organela recebendo um envelope transitório. Este envelope é perdido e as proteínas do capsídeo externo são adicionadas à partícula. Os virions completos são liberados das células infectadas por um transporte vesicular não convencional que não passa pelo Complexo de Golgi (Adaptado de Estes, 2001).

2.3.3 Patogênese

Os RVs infectam enterócitos do intestino delgado e causam diarreia aquosa e abundante que pode ser explicada por mecanismos independentes e complementares. Nas primeiras horas da infecção, quando ainda não existe lesão histopatológica, a diarreia é ocasionada pela ação enterotóxica de NSP4. Esta proteína é sintetizada na célula infectada e uma fração significativa é secretada antes da morte celular (Zhang *et al*, 2000; Bugarcic & Taylor, 2006). As moléculas de NSP4 secretadas atuam de forma parácrina nas células vizinhas, provavelmente se ligando em receptores presentes na superfície apical, ainda não determinados. A ligação de NSP4 perturba a via de transdução de sinais e aumenta os níveis de

cálcio intracelular afetando a permeabilidade da membrana plasmática causando efluxo de cloreto, sódio e água (Tian *et al*, 1994; 1995; Ball *et al*, 1996). Além disso, NSP4 é um inibidor específico e não competitivo do simporte Na⁺/glicose e de outros solutos, como os aminoácidos e dessa maneira prejudica a absorção desses nutrientes e a reabsorção de água, contribuindo com o processo de má absorção antes da destruição celular (Halaihel *et al*, 2000a, b).

Outro mecanismo que explica a secreção de fluidos e eletrólitos durante a infecção é a ativação do sistema nervoso entérico. A presença dos vírus e/ou a ação de NSP4 levam as células infectadas a liberar citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico que ativam este sistema que atua aumentando a secreção (Lundgren & Svesson, 2003).

Ainda antes da destruição dos enterócitos, também é observada uma redução dos níveis de dissacaridases. Em 1998, Jourdan *et al* determinaram que a infecção pelos RVs não afeta a síntese, a maturação ou a estabilidade dessas enzimas, mas induz o bloqueio do seu transporte para a borda em escova, uma vez que causa importantes alterações no citoesqueleto da célula infectada. Essa redução leva à má absorção desses carboidratos aumentando o caráter osmótico da diarreia.

A partir de 24 horas de infecção já é observada lesão celular com atrofia e descamação das vilosidades, inflamação, infiltração mononuclear da lâmina própria e vacuolização das células epiteliais. Essa destruição induz a proliferação das células da cripta, secretoras de cloreto, reduzindo a capacidade digestiva e absorviva do epitélio e acentuando a diarreia (Davidson *et al*, 1977).

2.3.4 Classificação

Os RVs são classificados sorologicamente em grupos e em sorotipos dentro de cada grupo. Um grupo inclui vírus que compartilham antígenos de reação cruzada detectáveis por diversos testes sorológicos como imunofluorescência, ensaio imunoenzimático e imunomicroscopia eletrônica.

Com base na variação antigênica da proteína VP6, os RVs são classificados em sete grupos distintos (A-G), conforme anteriormente descrito, e em subgrupos (I, II, I+II, ou não I não II). As proteínas VP4 e VP7 do capsídeo externo ou seus respectivos genes, definem, no grupo A, os sorotipos/genótipos P (protease sensível) e G (glicoproteína), respectivamente (Estes, 2001). Os sorotipos são

determinados pela reatividade com anticorpo monoclonal (Taniguchi *et al*, 1987) enquanto que os genótipos são determinados pela análise de seqüência ou hibridização de regiões conservadas (Gouvea *et al*, 1990; Gentsch *et al*, 1992).

A análise através de ensaios de neutralização com anticorpos monoclonais identificou até o momento dez sorotipos P. Os sorotipos são denominados pela letra P maiúscula e um numeral arábico seguido de uma letra do alfabeto maiúscula, por exemplo, sorotipo P1A. A análise da seqüência do gene por hibridização ou por PCR identificou até o momento 27 genótipos P (Martella *et al*, 2006, 2007; Khamrin *et al*, 2007), 11 destes isolados de humanos, que são nomeados pela letra P maiúscula seguida de um numeral colocado entre colchetes, por exemplo, P[8]. Não existe uma correlação clara entre sorotipos e genótipos para VP4 (Estes, 2001).

A análise através de ensaios de neutralização e por hibridização, PCR ou sequenciamento permitiu identificar até o momento 16 genótipos/sorotipos G, dez destes isolados em humanos (Estes, 2001; Gulati *et al*, 2007). São denominados pela letra G maiúscula (de glicoproteína) seguida de um numeral arábico, por exemplo, G1. Como a relação entre genótipos e sorotipos para a proteína VP7 é bem estabelecida, a nomenclatura é a mesma.

Como os genes que codificam as proteínas VP4 e VP7 estão em segmentos diferentes e segregam de maneira independente, diversas combinações de G e P são possíveis. Os genótipos G e P descritos em humanos mais comuns são G1-G4, G9, P[4] e P[8] e as combinações mais comuns entre eles são: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] (Gentsch *et al*, 2005; Santos & Hoshino, 2005). Tipos incomuns como G5, G8, G12 e P[6], assim como infecções mistas, vêm sendo descritas no mundo e também no Brasil (Timenetsky *et al*, 1994; Alfieri *et al*, 1996; Leite *et al*, 1996; Adah *et al*, 1997; Santos *et al*, 1998; Cunliffe *et al*, 1999; Bon *et al*, 2000; Araújo *et al*, 2001; Das *et al*, 2003; Bok *et al*, 2001; Esona *et al*, 2004; Pietruchinski *et al*, 2006).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

2.4.1 Transmissão

Os RVs são transmitidos pela via fecal-oral, pessoa a pessoa e pela ingestão de água e alimentos contaminados. A administração oral de suspensão de fezes positiva para RVs induz diarreia em voluntários (Kapikian *et al*, 1983). Existem evidências de que a transmissão também ocorra pela via respiratória (Linhares *et al*, 1981; Gurwith *et al*, 1981).

Durante a infecção, um grande número de partículas virais é excretado nas fezes (10^9 a 10^{10} partículas/g de fezes) e, portanto, pequena quantidade é capaz de contaminar o ambiente. Além disso, as partículas são resistentes à inativação física contribuindo para a transmissão dos RVs. Infecções constantes em enfermarias e alta taxa de infecções nosocomiais são características que reforçam a contaminação do ambiente como importante fonte de infecção (Aitken & Jeffries, 2001; Swierkosz, 2001).

A transmissão dos RVs também é facilitada pela baixa dose infecciosa requerida para o início da infecção, de uma a 100 partículas (Ward *et al*, 1986).

2.4.2 Faixa etária e sazonalidade

Infecção sintomática causada por RVs ocorre principalmente em crianças na faixa etária entre seis meses a dois anos com praticamente todas as crianças sendo infectadas pelo menos uma vez até os três anos (Glass *et al*, 2006; Parashar *et al*, 2006). Crianças menores de três meses desenvolvem menos sintomas, provavelmente pela proteção conferida pela amamentação ou pela imaturidade do epitélio intestinal que possui, nesta idade, uma quantidade menor de proteases intestinais que são necessárias para a entrada do vírus na célula (Yolken *et al*, 1992). Como cada infecção natural confere proteção crescente contra novas infecções, o número de infecções diminui com a idade e a maior gravidade da doença é geralmente limitada à primeira infecção. Portanto, infecção assintomática também é incomum entre crianças maiores de cinco anos (Bishop *et al*, 1983; Velazquez *et al*, 1996; Bresee *et al*, 2005).

Em países de clima temperado, os RVs apresentam uma distribuição sazonal com os picos de infecção ocorrendo nos meses frios e com poucos casos ocorrendo no verão. Nos países de clima tropical, como o Brasil, a doença pode ocorrer durante todo o ano, embora picos sazonais possam ser observados especialmente em meses frios e secos (Estes, 2001; Rosa e Silva *et al*, 2001; Araújo *et al*, 2002; Cardoso *et al*, 2003; Carneiro *et al*, 2005; Carvalho-Costa *et al*, 2006).

2.4.3 Distribuição dos genótipos de RVs do Grupo A

Conforme anteriormente citado, a análise da distribuição mundial dos genótipos de RVA indica que as combinações mais freqüentes são G1P[8], G2P[4], G3P[8] e G4P[8] e ainda apontam o genótipo G9 como uma cepa emergente (Gentsch *et al*, 2005; Santos & Hoshino, 2005).

Gentsch *et al* (2005) revisaram artigos publicados até 2004, realizados em 35 países, envolvendo mais de 21.000 cepas, e observaram que os quatro genótipos principais representaram quase 72% do total e que mais de 2% era constituído por duas combinações com o genótipo emergente G9 (G9P[8] e G9P[6]). Aproximadamente 6% das cepas continham 25 outras combinações de G e P. Os pesquisadores também observaram a importância de sorotipos não G1-G4 como causa de diarreia em crianças, como as cepas G5P[8] no Brasil, G8P[6] e G8P[4] em Malawi e G9P[6] na Índia.

Santos e Hoshino (2005) revisaram 124 artigos publicados entre 1989 e 2004, envolvendo 45.571 cepas. Nesta revisão, os quatro genótipos mais comuns representaram 88,5% das cepas avaliadas. Analisando a distribuição dos genótipos por continentes/subcontinentes, verificaram variações importantes entre estes locais. As quatro combinações mais comuns representaram mais de 90% das infecções por RVA na América do Norte, Europa e Austrália enquanto na América do Sul e Ásia representaram 68% e na África, 50%. Cepas com outras combinações, consideradas não usuais, foram descritas em todo o mundo e representaram 4,9% de todos os isolados e foram mais comuns - 27% e 14% - na África e na Ásia, respectivamente. Na América do Sul estas cepas representaram 11%.

O genótipo G9 tem sido encontrado com freqüências crescentes e respondeu por 9,6%, das infecções por RV entre 1973 e 2002 na Austrália, freqüência maior do que

a dos genótipos G3 e G4 que são comuns mundialmente. Na América do Sul o genótipo G9 foi mais prevalente do que G3 tornando-se o quarto genótipo mais comum no continente. Quanto aos genótipos P, P[8] foi o tipo predominante e junto com P[4] respondeu por mais de 90% das infecções, exceto na África onde o padrão de distribuição foi diferente, com P[6] sendo encontrado em quase um terço das infecções (Santos & Hoshino, 2005).

Estudos sobre a distribuição dos genótipos de RVA são conduzidos no Brasil desde 1982, como pode ser observado no Quadro A1 (Anexo 1) e fornecem bons dados sobre a distribuição dos genótipos em diversas regiões. De maneira geral, as frequências relativas e a distribuição dos genótipos no Brasil são semelhantes àquelas descritas em outros países, com os genótipos G1-G4, P[8] e P[4] sendo os mais prevalentes. Contudo, outros genótipos também têm sido detectados e pode ser observada a circulação de uma grande diversidade de genótipos G e P simultaneamente, ocorrência freqüente de genótipos G e/ou P e combinações não usuais além de alta proporção de infecções mistas (Anexo 1).

A análise dos genótipos circulantes em determinada área geográfica permite observar o fenômeno de flutuação temporal das cepas. Este fenômeno pode ser observado no Brasil (Anexo 1) e em diversos continentes (Beards *et al*, 1989; Unicomb *et al*, 1999; Iturriza-Gomara *et al*, 2000a).

Estes dados demonstram a necessidade de determinação constante dos genótipos circulantes em uma determinada área geográfica, que são diversos e variáveis em função do tempo, sobretudo, no que diz respeito à vigilância da eficácia de controle da diarreia por imunização.

2.5 DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

As manifestações clínicas da infecção causada por RVs não são específicas do agente etiológico para permitir um diagnóstico clínico. Por isso, a identificação das partículas virais, do antígeno ou do ácido nucléico viral ou a demonstração da resposta imunológica são necessárias para confirmar o diagnóstico.

A presença de grande quantidade de partículas nas fezes dos doentes permitiu o emprego ou o desenvolvimento de técnicas para a detecção do vírus diretamente das amostras fecais. A primeira metodologia empregada foi a MET (Flewett *et al*,

1973; Bishop *et al*, 1974; Brandt *et al*, 1981). As grandes vantagens desta técnica são a alta especificidade, uma vez que os RVs possuem uma morfologia característica, e o fato de permitir a detecção em 80% a 90% das amostras positivas (Brandt *et al*, 1981). A MET continua sendo uma importante ferramenta diagnóstica especialmente quando ocorre discordância em outras técnicas. A desvantagem do uso da MET na identificação da partícula, se refere ao limite de detecção da técnica, de 10^8 partículas/mL de material clínico. Entretanto, o número de partículas de RVs que são eliminadas pelo paciente infectado varia de 10^9 a 10^{10} por grama de fezes. Logo, a utilização da imunomicroscopia eletrônica (IMET), que utiliza anticorpos para agregação das partículas virais seguida por centrifugação, anteriores a contração negativa, comumente não se faz necessário. Além disso, a morfologia dos RVs é característica, podendo ser identificada sem a utilização da IMET (Nakata *et al*, 1987; Suzuki *et al*, 1987).

Diversos métodos diagnósticos foram desenvolvidos para pesquisa de antígenos virais como: ensaios imunoenzimáticos (Beards *et al*, 1981,1984; Pereira *et al*, 1985), testes de aglutinação em látex (Hughes *et al*, 1984; Brandt *et al*, 1987), ensaio de hemaglutinação passiva reversa (*reverse passive hemagglutination assay* - RPHA) (Fujii *et al*, 2000) e imunocromatografia (Al-Yousif *et al*, 2002).

Os RVs também podem ser detectados através da pesquisa do genoma viral. O ácido nucléico inicialmente é extraído das amostras fecais por lise das células e dissociação da ribonucleoproteína viral com isotiocinato de guanidina e purificado com partículas de sílica (Boom *et al*, 1990), pó de vidro (Gentsch *et al*, 1992), pelo método de extração com fenol-clorofórmio e precipitação por etanol. O ácido nucleico é então evidenciado pela eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) corado com nitrato de prata, onde apresenta um padrão de migração característico (Boulikas & Hancock, 1981; Pereira *et al*, 1983). Esta técnica, como discutido anteriormente, além da detecção permite também a classificação da maioria das cepas quanto ao Grupo e quanto ao perfil de migração (supercurto, curto e longo).

A diversidade genética pode ser determinada pela análise dos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7 através de sequenciamento ou RT-PCR seguida de multiplex semi-nested PCR (Gouvea *et al*, 1990; Gentsch *et al*, 1992). As cepas de RVA podem ser classificadas nos tipos P e G, conforme anteriormente descrito, de acordo com as diversidades antigênicas e genéticas das suas proteínas do

capsídeo, VP4 (tipo P) e VP7 (tipo G) (Estes, 2001). A diversidade antigênica pode ser avaliada pela reação com anticorpos monoclonais realizando a sorotipagem (Taniguchi *et al*, 1987; Souza *et al*, 2003).

Um outro ensaio desenvolvido para permitir a genotipagem das cepas de RVA é o *Microarray (microensaio)* que permite a determinação dos genótipos virais com uma única reação após a RT-PCR. Este teste foi proposto com objetivo de facilitar o processo de genotipagem, uma vez que a quantidade de anticorpos monoclonais disponíveis é limitada e o uso da PCR é complexo e demanda muito tempo quando um número muito grande de amostras precisa ser analisado (Lovmar *et al*, 2003).

2.6 ASPECTOS DA RESPOSTA IMUNE

Estudos sobre a história natural das infecções pelos RVs têm demonstrado imunidade protetora induzida por infecções nos primeiros anos de vida. As primeiras infecções após o período neonatal são geralmente sintomáticas, poucas crianças apresentam doença grave durante uma reinfecção e, após a segunda infecção, reinfecções são incomuns. Estes achados indicam que imunidade protetora pode ser induzida por vacinas orais (Bishop *et al*, 1983, Bhan *et al*, 1993; Velazquez *et al*, 1996; Glass *et al*, 2006). O mecanismo de imunidade gerada contra a infecção pelos RVs ainda não está completamente esclarecido. A imunidade local no intestino parece ser crítica, entretanto é difícil de ser mensurada e é de curta duração. Por isso, a detecção de anticorpos IgA circulantes tem sido utilizados para avaliar a resposta à vacinação.

Estudos em modelos animais indicam que a infecção pelos RVs induz rápida resposta imune humoral tanto no intestino quanto no soro, com produção de anticorpos IgM seguida de IgG e IgA (Feng *et al*, 1994). Embora existam poucas informações provenientes de estudos realizados em humanos, parece que resposta predominantemente homotípica ou sorotipo-específica é induzida após a primeira infecção natural ou após a vacinação e é mediada pelos anticorpos anti-VP7 e anti-VP4 (Hoshino *et al*, 1988; Andrew *et al*, 1992; Ward, 1996; Estes, 2001) e que resposta heterotípica é induzida após múltiplas infecções. Entretanto, resposta heterotípica induzida por uma única infecção também tem sido detectada (Brussow *et al*, 1988, 1990; Arias *et al*, 1994). A ocorrência de duas infecções, sintomáticas ou assintomáticas, resultam em completa proteção contra doença moderada a

grave. Este achado implica que vacinas atenuadas que causam infecções assintomáticas podem induzir imunidade protetora. Uma vez que duas infecções naturais são necessárias para a proteção completa contra doença moderada a grave, seriam necessárias mais de uma dose da vacina atenuada para atingir eficácia semelhante à gerada pela exposição ao vírus selvagem (Velazquez *et al*, 1996; Ruiz-Palacios *et al*, 2006).

2.7 CONTROLE

Conforme descrito, a diarreia causada pelos RVA tem importância em todo o mundo causando muitas hospitalizações e mortes (Parashar *et al*, 2006). A incidência da doença é semelhante em países desenvolvidos e em desenvolvimento sugerindo que melhorias nas condições de higiene e de saneamento básico não são suficientes para controlar esta infecção (de Zoysa & Feachem, 1985; Parashar *et al*, 2003). Sabe-se ainda que as primeiras infecções durante a vida podem induzir imunidade contra doença grave em reinfecções. Com base nestes dados, a OMS e a Aliança Global para Vacina e Imunizações (GAVI), consideraram a produção de uma vacina eficaz e segura a melhor estratégia para reduzir o número e a gravidade dos casos da doença, tornando o seu desenvolvimento uma prioridade (WHO, 2000; Glass *et al*, 2005).

A primeira candidata à vacina anti-RVs, desenvolvida em 1983, foi derivada de uma cepa bovina RIT 4237 e não mostrou eficácia consistente em testes realizados em países em desenvolvimento e as pesquisas foram encerradas (Vesikari *et al*, 1984; Glass *et al*, 2006).

Em 1998, 15 anos após os primeiros achados, foi licenciada nos Estados Unidos, a primeira vacina contra RVs, denominada Rotashield® (Wyeth-Lederle, Pearl River, NY, USA). Esta vacina era tetravalente (G1-G4) e formada pela cepa de macaco Rhesus, semelhante a G3 humana e por três cepas “reestruturadas” Rhesus-humano contendo os genes que codificam as proteínas do capsídeo externo dos sorotipos humanos mais comuns G1, G2 e G4, induzindo desta maneira anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos mais comuns. Esta vacina, em 1999 teve seu uso suspenso e a produção descontinuada após relatos de casos de

intussuscepção, ocorridos nas duas primeiras semanas após a administração da primeira dose, entre as crianças vacinadas (Kapikian *et al*, 1996; Glass *et al*, 2006).

A vacina pentavalente Rotateq[®] (Merck), desenvolvida a partir da cepa bovina WC3 “reestruturada” com os genes dos quatro genótipos G e do genótipo P mais comuns (G1-G4 e P[8]) (Clark *et al*, 1996) é baseada no conceito de imunidade sorotipo-específica e, em teoria, contém os antígenos dos sorotipos humanos mais comuns gerando uma proteção satisfatória. A vacina mostrou-se segura e eficaz reduzindo 74% de todas as infecções e 98% das infecções graves. Foi licenciada pela *US Food and Drug Administration* em fevereiro de 2006, é administrada por via oral em três doses e faz parte da rotina de imunização das crianças nos EUA (Bresee *et al*, 2005; Glass *et al*, 2006).

A vacina monovalente G1P[8] Rotarix[®] (GlaxoSmithKline) é formada pela cepa RIX 4414 (cepa humana atenuada) e é administrada por via oral, em duas doses. Rotarix[®] está baseada no conceito de que a infecção com um sorotipo de RVA humano pode gerar proteção heterotípica pela presença de antígenos de reação cruzada (Bernstein *et al*, 1999; Gentsch *et al*, 2005). Para verificar a eficácia e a segurança desta vacina, foram realizados ensaios clínicos na Finlândia, na América Latina e na Ásia envolvendo 6.670 crianças (Vesikari *et al*, 2004; Salinas *et al*, 2005). Ainda para avaliar qualquer risco potencial de intussuscepção até 31 dias após a administração de cada uma das duas doses, bem como qualquer outro evento adverso grave, foi realizado um ensaio clínico de fase três envolvendo mais de 63.000 pacientes, na América Latina e na Finlândia. Com estes estudos, a vacina mostrou-se bastante segura e com proteção de 91% contra cepas homólogas G1P[8], 87% contra cepas que compartilham apenas o genótipo P[8] vacinal e 45% contra cepas que não compartilham nem o genótipo G nem o P vacinal. Avaliando os resultados das fases anteriores, concluiu-se ainda que há proteção de 67% contra a cepa G2P[4] indicando proteção, embora menor, contra cepas que não compartilham epitopos com a cepa vacinal (Ruiz-Palacios *et al*, 2006). Diante destes resultados, a vacina Rotarix[®] foi licenciada no mercado internacional em julho de 2004 e em julho de 2005 pela ANVISA, no Brasil e passou a fazer parte do PNI a partir de março de 2006.

Uma preocupação mundial após o licenciamento destas vacinas é quanto à eficácia nas regiões em desenvolvimento, onde existe uma diversidade genotípica maior,

podendo ter genótipos mais prevalentes não incluídos na vacina e ainda diferenças inerentes aos pacientes, como idade da primeira infecção, estado nutricional e infecções concomitantes (Bresee *et al*, 2005; Gentsch *et al*, 2005; Santos & Hoshino, 2005).

Devido à conhecida diversidade antigênica dos RVA e a possibilidade de ocorrerem “reestruturações” (*reassortment*) no genoma viral, além de mutações, é necessário um contínuo monitoramento molecular das cepas circulantes para que sejam evidenciadas mudanças importantes no padrão epidemiológico deste vírus, que poderão influenciar na eficácia da vacina implantada e ainda orientar a formulação de novas vacinas (Bresee *et al*, 2005; Gentsch *et al*, 2005; Santos & Hoshino, 2005).

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Determinar os genótipos G e P de RVA associados à diarreia aguda, de crianças provenientes da Grande Vitória, atendidas no PS do HINSG de fevereiro de 2003 a junho de 2004, e no Centro Integrado de Assistência a Saúde (CIAS/UNIMED) nos anos de 2004 a 2006, em período anterior à instituição de imunização nacional para RVA.

3.2 ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinar eletroferotipo e prevalência de infecção por RVs em crianças hospitalizadas ou não do CIAS-UNIMED;

3.2.2 Implementar as metodologias de RT-PCR e de multiplex semi-nested PCR para a caracterização molecular dos genótipos de RVA;

3.2.3 Determinar os genótipos G e P circulantes em período pré-implantação de vacinação para RVA;

3.2.4 Avaliar distribuição dos genótipos de RVA nos períodos estudados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Este estudo é do tipo corte transversal com amostras de conveniência a partir de demanda hospitalar. Os pacientes que compõem a amostra foram triados no PS-HINSG e no CIAS/UNIMED. O HINSG é um hospital de referência da rede estadual do Serviço Único de Saúde (SUS), localizado na cidade de Vitória-ES, que alberga uma residência médica em Pediatria, atendendo aos municípios da Região Metropolitana de Vitória, assim como a outros municípios do Estado do Espírito Santo, do Sul da Bahia e do Sudeste de Minas Gerais. O CIAS/UNIMED é um hospital que atende pacientes conveniados de várias regiões da Grande Vitória.

4.2 CASOS E ESPÉCIMES

Fluxograma de processamento das amostras pode ser observado no Anexo 2.

4.2.1 Amostras do Pronto Socorro do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória

Foram obtidas 253 amostras fecais, por eliminação espontânea ou com sonda retal nº 8, de pacientes de ambos os sexos, de zero a três anos de idade (11 deles entre 34 e 38 meses) e mediana de 11 meses. O quadro clínico foi compatível com diarreia aguda, sendo 90% dos casos atendidos nos primeiros sete dias da doença (média de 3,6 dias). A coleta dos espécimes ocorreu no período entre fevereiro de 2003 e junho de 2004, após consentimento por escrito do responsável pela criança, e foi realizado por Dra. Ana Daniela Isoton de Sadovsky durante a sua dissertação de mestrado (Sadovsky, 2005).

Essas amostras foram submetidas a procedimentos para detecção de bactérias enteropatogênicas (*Salmonella* spp, todas as espécies de *Shigella* e categorias diarreiogênicas de *Escherichia coli*), de protozoários e de vírus (RV e adenovírus) (Sadovsky, 2005) no Laboratório de Gastroenterite Infecciosa (LAGI) ou no Laboratório de Virologia do Núcleo de Doenças Infecciosas (LABVIR/NDI). Os espécimes foram mantidos em freezer a -20°C, *in natura* e/ou em suspensão em tampão tris-cálcio (Item 4.4), para estudos posteriores. Oitenta e três amostras determinadas serem positivas para RVA através da pesquisa de ácido nucleico viral

por EGPA passaram a compor a amostra do presente estudo de genotipagem. Duas amostras não tiveram material suficiente para a realização dos testes. Dessa forma, foram estudadas 81 amostras positivas para RVA provenientes do PS-HINSG.

A maioria das crianças com amostras positivas para RVA (88%) procedeu dos municípios da Serra, Vitória e Cariacica, proporcional ao número de crianças desses municípios que recorreram ao PS do HINSG (86%). A distribuição dos casos positivos para RVA incluídas neste estudo, por município de origem, está demonstrada na Figura 5.

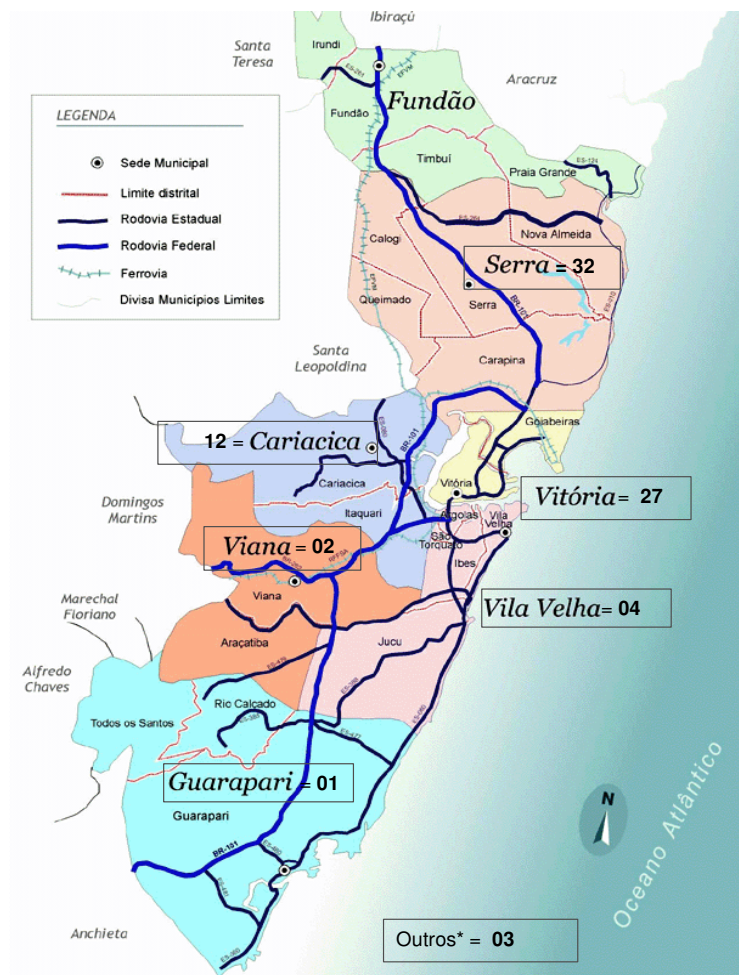


Figura 5: Distribuição dos casos positivos para RVA do PS-HINSG segundo o município de origem.

Noventa e um por cento (73/81) das cepas de RVA foram detectadas em crianças com até dois anos de idade, sendo somente uma delas encontrada acima do 36º mês de vida (47 meses). A distribuição dos pacientes por faixa etária está descrita na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição do número total de casos positivos para RVA, provenientes do HINSG por faixa etária.

Faixa etária (meses)	Número de pacientes (%)
0 – 6	18 (22)
7 – 12	28 (35)
13 - 24	28 (35)
25 - 36	06 (7)
> 36	01 (1)
Total	81 (100)

4.2.2 Amostras do CIAS/UNIMED

Foram obtidas 68 amostras fecais por eliminação espontânea, de pacientes de ambos os sexos, com até 12 anos (somente cinco acima de quatro anos), com quadro compatível com gastroenterite aguda. A coleta dos espécimes foi realizada, após consentimento do responsável pela criança, nos anos 2004 (n= 6), 2005 (n= 33) e 2006 (n= 29), cinco delas atendidas na emergência e 63 internadas no CIAS/UNIMED, Vitória/ES. Gastroenterite foi diagnóstico de admissão no hospital em 64 casos (94%), as demais (4/68) adquiriram a infecção após hospitalização.

Essas amostras foram submetidas a procedimentos para detecção de vírus (RVs e norovírus) no LABVIR/NDI. Os espécimes foram mantidos em freezer a -20°C, *in natura* e/ou em suspensão em tampão tris-cálcio (item 4.4), para estudos posteriores. RVs foram pesquisados através de EGPA e amostras positivas fizeram parte do estudo de genotipagem.

4.3 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do CIAS, em 14 de outubro de 2004 (Anexo 3).

4.4 PREPARO DE SUSPENSÃO FECAL

Suspensões fecais a 10% foram preparadas em tampão Tris/Cálcio (0.01M/0,015M), centrifugadas a 2.000xg a 4°C por 20 min. O sobrenadante foi coletado e novamente armazenado em freezer -20°C até realização da extração de RNA viral e das reações de genotipagem.

4.5 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO VIRAL

As suspensões fecais a 10% foram submetidas ao método de extração do RNA de viral, utilizando isotiocinato de guanidina / EDTA como agente de lise celular e de dissociação da ribonucleoproteína viral conforme descrito por Boom *et al* (1990) e relacionado a seguir: a 400 µL da suspensão fecal foram adicionados 1.000 µL de tampão L6, homogeneizados e mantidos à temperatura ambiente (TA) por 5 min. Em seguida, foram adicionados 15 µL de sílica e a mistura foi homogeneizada, incubada sob agitação por 20 min à TA e centrifugada a 16.000xg/2 min. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento, contendo a sílica com ácido nucléico adsorvido, foram adicionados 500 µL de tampão L2, seguido de homogeneização e centrifugação (16.000xg/ 2 min). Novamente o sobrenadante foi descartado e, ao sedimento, foram adicionados 500 µL de etanol 70% gelado seguido por homogeneização e centrifugação (16.000xg/ 2 min). Após descarte do sobrenadante foram adicionados, ao sedimento, 500 µL de acetona PA gelada seguida de homogeneização, centrifugação (16.000xg/ 2 min), descarte do sobrenadante e incubação do sedimento em banho-maria (BM) a 56°C por 15 min para evaporação completa da acetona. Foram adicionados 60 µL de H₂O deionizada tratada com Dietil Pirocarbonato (DEPC, Sigma – Spruce St, St Louis, MO-USA), homogeneizados e incubados em BM 56°C por 15 min. Após homogeneização e centrifugação (16.000xg/ 4 min), 40 µL do sobrenadante contendo o ácido nucléico extraído foram

coletados. O RNA extraído foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) para a obtenção do DNA complementar (cDNA), conforme descrito no item 4.7.

4.6 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (EGPA)

EGPA do ácido nucléico extraído foi realizada em: i) amostras provenientes de crianças atendidas no PS do HINSG que se mostraram negativas nas reações de amplificação do ácido nucleico viral pela PCR e multiplex semi-nested-PCR (snPCR), (descritas no item 4.7) a fim de verificar a integridade do RNA viral; ii) todas as amostras obtidas das crianças atendidas no CIAS-UNIMED. Este experimento foi realizado conforme descrito por Pereira *et al* (1983), onde o RNAdf extraído é submetido a uma eletroforese vertical em gel de poliacrilamida composto por um gel concentrador (4%) e um separador (7,5%). A corrida foi realizada em tampão Tris-glicina por aproximadamente três horas. Após a corrida, o gel foi corado pelo método de impregnação pela prata, descrito a seguir (Boulikas & Hancock, 1981).

4.6.1. Método de impregnação pela prata

O gel foi tratado com a solução fixadora por 30 min em agitador orbital e, após remoção, incubado com solução de nitrato de prata por 30 min, seguido por duas lavagens com água destilada. O gel foi então incubado com a solução reveladora para redução da prata e evidenciar as bandas. A revelação foi interrompida com solução de ácido acético, e, por sua vez, interrompido pela solução de etanol. O gel foi observado em negatoscópio para a observação dos 11 segmentos característicos de RVs e determinação dos eletroferotipos, de acordo Herring *et al* (1982).

4.7 RT-PCR e MULTIPLEX SEMI-NESTED PCR

As amostras positivas para RVA foram submetidas à reação de RT para a obtenção do DNA complementar (cDNA) e PCR seguida de multiplex semi-nested PCR (snPCR) para a determinação dos genótipos conforme protocolo gentilmente cedido pelo Dr José Paulo Gagliard Leite, do Laboratório de Virlogia Comparada da FIOCRUZ.

4.7.1 Transcrição reversa (RT)

Para a obtenção do cDNA, cinco microlitros da suspensão de RNA extraído foi homogeneizado com 1 µL de dimetil-sulfóxido (DMSO – Sigma), desnaturado por 7 min a 97°C e refrigerado a 4°C, em termociclador Perkin Elmer CETUS. Foi então adicionado 19 µL da mistura de reação contendo: tampão de reação (20 mM de tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl), 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 100 U de transcriptase reversa e 0,265 µg/reação do iniciador randômico hexanucleotídeo pdN₆TM (Amersham Bioscience UK) (Iturriza-Gomara *et al.*, 1999). A mistura foi incubada a 48°C por 60 min seguido de 95°C por 10 min. O cDNA obtido foi conservado à temperatura de -20°C até ser submetido à PCR.

4.7.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) e multiplex semi-nested PCR (snPCR)

Os genótipos P e G de RVA foram determinados pela análise dos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7, respectivamente, através de reações de PCR e de multiplex snPCR, em reações separadas para cada gene (Gouvea *et al.*, 1990; Gentsch *et al.*, 1992; Das *et al.*, 1994).

4.7.2.1 PCR

Para a obtenção do fragmento consensual dos genes estudados, foram realizadas duas reações de PCR. Um volume de 2,5 µL de cDNA foi utilizado em um volume total de 25 µL de mistura de reação separadas, contendo 0,5 U de Taq DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl₂ e 200 µM de cada dNTP, tampão de reação (20 mM de tris-HCl, pH 8,4; 50 mM de KCl) e par de iniciador consensual para P (4con2 e 4con3) (Gentsch *et al.*, 1992) ou para G (9con1 e 9con2) (Das *et al.*, 1994) em concentração final de 10 pmol cada. O programa de amplificação se encontra no Quadro 1. A seqüência dos iniciadores, a posição relativa nos genes e o tamanho dos fragmentos obtidos estão demonstrados no Quadro 2 e nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

Quadro 1: Programa de amplificação utilizado na PCR

Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
94	2 min	1
94	30 seg	35
50	30 seg	
72	1 min	
72	10 min	1
4	≤ 24 hrs	1

Quadro 2: Seqüência dos iniciadores utilizados na PCR

Iniciador p/	Nome do iniciador	Seqüência (5'-3')	Posição (nt)
P*	4con2 (-)	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	887 – 868
	4con3 (+)	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	11 – 32
G**	9con1 (+)	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG	37 – 56
	9con2 (-)	GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA	922 – 941

*Gentsch *et al*, 1992;**Das *et al*, 1994.

4.7.2.2 Multiplex semi-nested PCR

Um microlitro do produto da PCR foi utilizado para genotipagem em reação de multiplex snPCR contendo iniciador 4con3 e *pool* de iniciadores para P (P[4], P[6], P[8] e P[9]) (Gentsch *et al*, 1992) ou iniciador 9con1 e *pool* de iniciadores para G (G1-G4 e G9) (Das *et al*, 1994), nas mesmas concentrações descritas na reação de PCR. O programa utilizado na amplificação se encontra no Quadro 3. A seqüência dos iniciadores, a posição relativa nos genes e o tamanho dos fragmentos obtidos estão demonstrados no Quadro 4 e nas figuras 6 e 7, respectivamente.

Quadro 3: Programa de amplificação utilizado na multiplex snPCR

Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
94	2 min	1
94	30 seg	30
47	50 seg	
72	1 min	
72	10 min	1
4	≤ 24 hrs	1

Quadro 4: Seqüência dos iniciadores utilizados na multiplex snPCR

snPCR	Nome do iniciador	Seqüência 5' - 3'	Posição (nt)
P*	4con3 (+)	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	11 – 32
	1T1 P[8] (-)	TCT ACT TGG GAT AAC GTG C	339 – 356
	2T1 P[4] (-)	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	474 – 494
	3T-1 P[6] (-)	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	259 – 278
	4T-1 P[9] (-)	TGA GAC ATG CAA TTG GAC	385 – 402
G**	9con1 (+)	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG	37 – 56
	9T1-1 (G1) (-)	TCT TGT CAA AGC AAA TAA TG	176 – 195
	9T1-2 (G2) (-)	GTT AGA AAT GAT TCT CCA CT	262 – 281
	9T-3P (G3) (-)	GTC CAG TTG CAG TGT TAG C	484 – 503
	9T-4 (G4) (-)	GGG TCG ATC GAA AAT TCT	423 – 440
	FT5 (G5)*** (-)	CAT GTA CTC GTT GTT ACG TC	760 – 779
	9T-9B (G9) (-)	TAT AAA GTC ATT GCA C	131 – 147

*Gentsch *et al*, 1992;**Das *et al*, 1994, ***Gouvea *et al*, 1994.

4.7.3 Eletroforese em gel de agarose

Para a observação e análise dos *amplicons* (produtos da amplificação), 10 μ L do produto obtido na PCR e na snPCR foram eluidos em 2 μ L do tampão de arrasto e aplicados em gel de agarose a 1,5% em tampão de corrida Tris-Borato-EDTA (TBE) pH 8,4, submetido a uma diferença de potencial de 100 V por uma hora. Posteriormente, o gel foi imerso em solução de brometo de etídio 0,5 μ g/mL sob suave agitação durante 10 min. Em seguida, o gel foi lavado e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta acoplado ao sistema *Eagle Eye*TM II de captura e documentação de imagem. Paralelo às amostras, foi aplicado no gel de agarose um padrão de peso molecular (Marcador de 100 ou 123 pb, Invitrogen[®]) para identificação do tamanho do *amplicon*. Na PCR os produtos esperados foram de 904 pb e de 876 pb para o fragmento consensual de G e de P, respectivamente. Na multiplex snPCR, o fragmento obtido foi comparado com os tamanhos esperados para cada genótipo conforme descrito nas figuras 6 e 7.

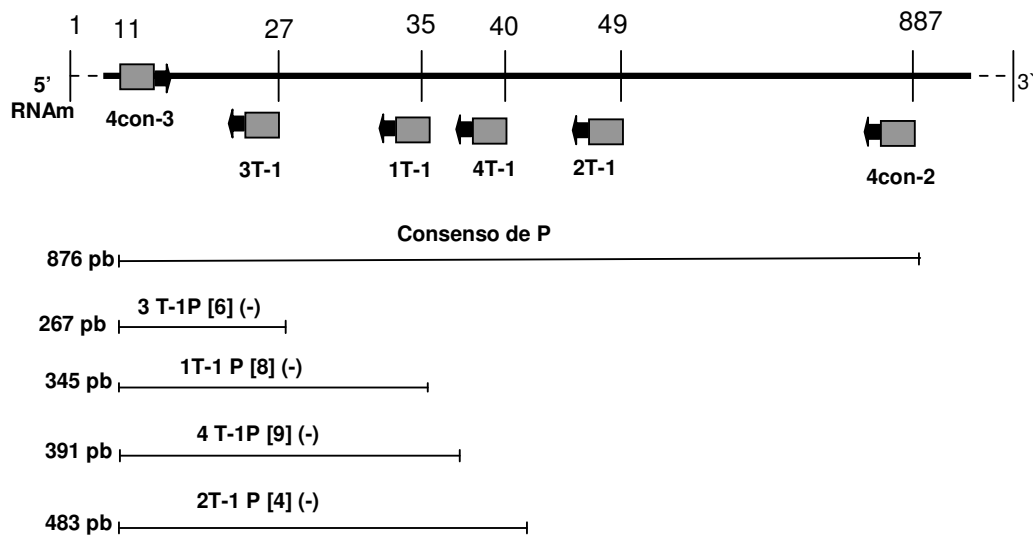


Figura 6: Representação esquemática dos iniciadores utilizados nas reações de PCR e de multiplex sn-PCR para P. Posições relativas no gene da proteína VP4 e tamanho dos fragmentos obtidos (adaptado de Gentsch *et al*, 1992).

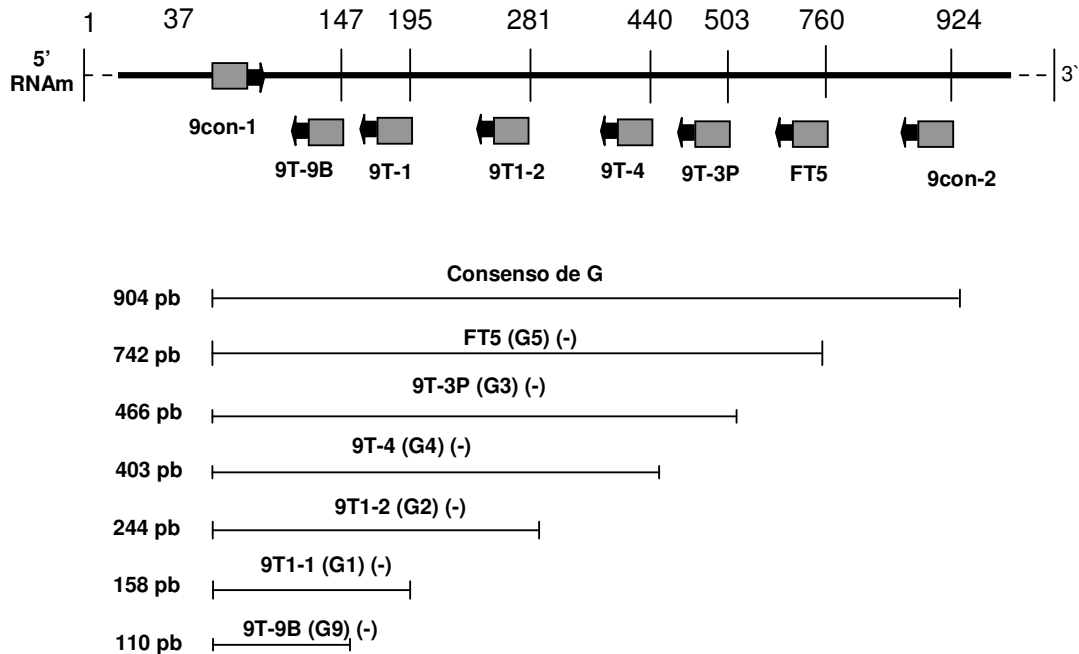


Figura 7: Representação esquemática dos iniciadores utilizados nas reações de PCR e sn-PCR para G. Posições relativas no gene da proteína VP7 e tamanho dos fragmentos obtidos (Das *et al*, 1994; Gouvea *et al*, 1994).

4.8 SOLUÇÕES E REAGENTES

4.8.1 Tampão para preparo da suspensão fecal

4.8.1.1 Tampão Tris-Ca⁺⁺ pH 7,2

Tris base 0,01M (Invitrogen – Faraday Ave., Carlsbad CA, USA) -----	1,21 g
Cloreto de cálcio 0,0015M (Dinâmica, Brasil) -----	0,22 g
Água Milli-Q q.s.p. -----	1000 mL

4.8.2 Reagentes para extração

4.8.2.1 Sílica

Dióxido de sílica (Sigma) -----	60 g
Água destilada q.s.p. -----	500 mL

4.8.2.2 Tampão L2

Isotiocianato de guanidina (Gibco BRL.) -----	120 g
Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4 (Invitrogen). -----	100 mL

4.8.2.3 Tampão L6

Triton X-100 -----	2,6 g
Isotiocianato de guanidina (Gibco BRL.) -----	120 g
EDTA 0,2M pH 8,0 (Sigma) -----	22 mL
Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4 (Invitrogen) -----	100 mL

4.8.2.4 Etanol 70%

Etanol PA (Dinâmica) -----	70 mL
Água Milli-Q q.s.p. -----	100 mL

4.8.2.5 Acetona PA

Acetona PA (Biotec – Brasil).

4.8.3 Soluções para EGPA

4.8.3.1 Tampão *Lower-tris* 4X pH 8,8

Tris base (Invitrogen) -----	36,34 g
Água Milli-Q q.s.p. -----	200 mL

4.8.3.2 Tampão *Upper-tris* 4X pH 6,8

Tris base (Invitrogen) -----	12,12 g
Água Milli-Q q.s.p. -----	200 mL

4.8.3.3 Persulfato de amônia a 10%

Persulfato de amônia (BioRad) -----	1 g
Água Milli-Q q.s.p. -----	10mL

4.8.3.4 Acrilamida/Bisacrilamida 50/1,5%

N' N' Metileno-Bisacrilamida (Sigma) -----	1,3 g
Acrilamida (Sigma) -----	50 g

4.8.3.5 TEMED (Sigma)

N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

4.8.3.6 Gel separador 7,5%

Água destilada -----	11,4 mL
Tampão Lower-tris pH 8,8 -----	5,0 mL
Acrilamida/bisacrilamida 50/1,5% -----	3,0 mL
Solução persulfato de amônio* 10% (BioRad) -----	0,6 mL
TEMED* (Sigma) -----	10 µL

*Acrescentados minutos antes do gel ser colocado para polimerizar

4.8.3.7 Gel concentrador 4%

Água destilada -----	3,05 mL
Tampão Upper-tris pH 6,8 -----	1,25 mL
Acrilamida/bisacrilamida (Sigma) 50/1,5% -----	0,4 mL
Solução de persulfato de amônio* 10% (BioRad) -----	0,3 mL
TEMED* (Sigma) -----	7,5 µL

*Acrescentados minutos antes do gel ser colocado para polimerizar

4.8.3.8 Tampão Tris-Glicina 4X pH 8,2

Tris base (Invitrogen) -----	12g
Glicina (Merck- Darmstadt, Germany) -----	57,68 g
Água destilada q.s.p. -----	1000 mL

Diluir a solução 1X para uso.

4.8.3.9 Solução fixadora

Etanol (Dinâmica) -----	20 mL
Ácido Acético (Grupo Química – Brasil) -----	1 mL
Água destilada q.s.p. -----	200 mL

4.8.3.10 Solução de nitrato de prata 0,001M

Nitrato de prata (Sigma) -----	0,185 g
Água destilada q.s.p. -----	100 mL

4.8.3.11 Solução reveladora

NaOH (Merk) -----	6 g
Formaldeído (Química Moderna - Brasil) -----	1,5 mL
Borohidreto de sódio (Nuclear - Brasil) -----	40 mg
Água destilada q.s.p. -----	200 mL

4.8.3.12 Solução de ácido acético 5%

Ácido acético (Grupo Química) -----	10 mL
Água destilada q.s.p. -----	200 mL

4.8.3.13 Solução de etanol 10%

Etanol (Dinâmica) -----	20 mL
Água destilada q.s.p. -----	200 mL

4.8.4 Soluções para gel de agarose

4.8.4.1 Gel de agarose 1,5%

Agarose (BioRad) -----	1,5 g
Água destilada q.s.p. -----	100 mL

4.8.4.2 Tampão de arrasto (*Loading solution*)

Azul de Bromofenol 5% -----	1,6 mL
Sacarose -----	16 g
Dodecil Sulfato de Sódio -----	0,2g
EDTA 0,1M pH 8,0 q.s.p -----	40mL

4.8.4.3 Tampão de corrida Tris-Borato-EDTA 10X pH 8,4

Tris-HCl (Invitrogen) -----	121,14g
Ácido bórico (Promega Corporation, WI - USA) -----	61,83g
EDTA (Sigma) -----	5,84g
Água destilada q.s.p -----	1000 mL

4.8.4.4 Brometo de Etídio 0,5 µg/mL

Brometo de Etídeo (Sigma) -----	7,5µL
Água destilada q.s.p -----	15mL

5 RESULTADOS

5.1 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

5.1.1 Amostras do Pronto Socorro do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória

EGPA de ácido nucleico extraído foi realizado com o objetivo de verificar a sua integridade. Das 81 amostras iniciais que compuseram o estudo, três amostras mostraram-se negativas na reações de PCR e snPCR e foram submetidas a EGPA. Destas, duas foram positivas e genotipadas posteriormente e uma amostra mostrou-se negativa e foi excluída. Logo, determinação dos genótipos foi realizada em 80 dos 81 casos iniciais.

5.1.2 Amostras provenientes do CIAS/UNIMED

EGPA de ácido nucleico extraído realizado nas 68 amostras fecais obtidas revelaram 14 casos positivos para RVs, todos do grupo A. Dez e quatro apresentaram eletroferotipo longo e curto, respectivamente (Figura 8). Doze casos de RVA ocorreram em crianças hospitalizadas e dois, na enfermaria da emergência.

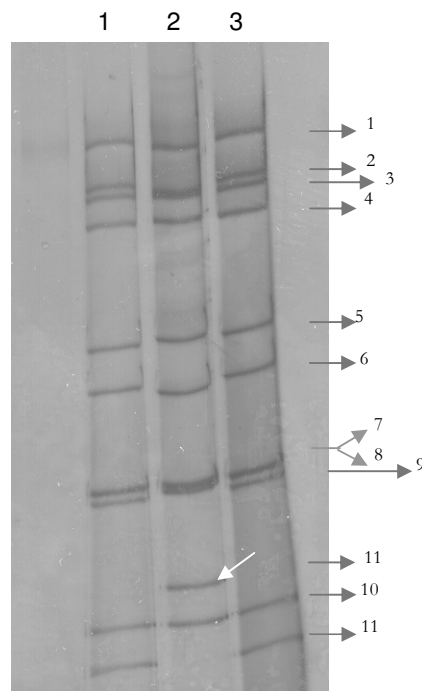


Figura 8: EGPA corado pelo método de impregnação pela prata, revelando os 11 segmentos de cepas de RV do grupo A (numeração à direita). Col 1 e 3: perfis longos; Col 2: perfil curto. Seta branca: indica posição de migração do 11º segmento que representa o perfil curto.

5.1.2.1 Características das amostras provenientes do CIAS/UNIMED

As infecções pelos RVA foram observadas entre os meses de junho a agosto, com dois, oito e quatro casos ocorrendo nos anos 2004, 2005 e 2006, respectivamente. A mediana de tempo de internação foi de 5,5 dias (Gráfico 1).

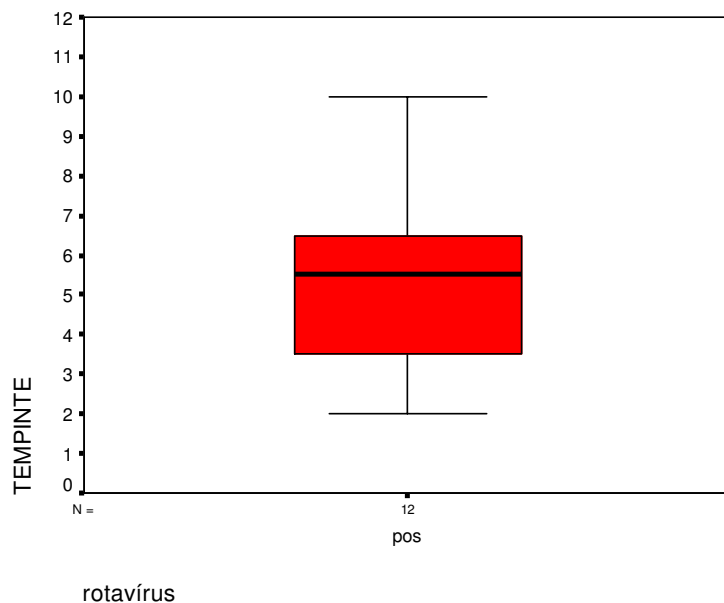


Gráfico 1: Mediana de tempo de hospitalização dos pacientes com RVA.

As crianças com amostras positivas para RVA procederam dos municípios de Vitória, Vila Velha e Serra com sete, quatro e três casos, respectivamente. Oitenta e cinco por cento (12/14) das cepas de RVA foram detectadas em crianças com até dois anos de idade, sendo somente uma delas encontrada acima do 36º mês de vida (47 meses). A distribuição dos pacientes por faixa etária está descrita na Tabela 2.

Tabela 2: Distribuição do número total de casos positivos para RVs do Grupo A provenientes do CIAS/UNIMED, por faixa etária.

Faixa etária (meses)	Número de pacientes (%)
0 – 6	01 (07)
7 – 12	03 (21)
13 - 24	08 (58)
25 – 36	01 (7)
> 36*	01 (7)
Total	14 (100)

*47 semanas

5.2 RT-PCR

Todas as cepas de RVA (80 do HINSG e 14 do CIAS/UNIMED) foram submetidas à reação de RT-PCR para a obtenção do fragmento consensual dos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7. Os *amplicons* dos genes P e G, fragmentos de 876 e 904 pb, respectivamente, foram observados após eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio (Figuras 9 e 10). Nem todas as amostras apresentaram o produto do fragmento consensual após a PCR.

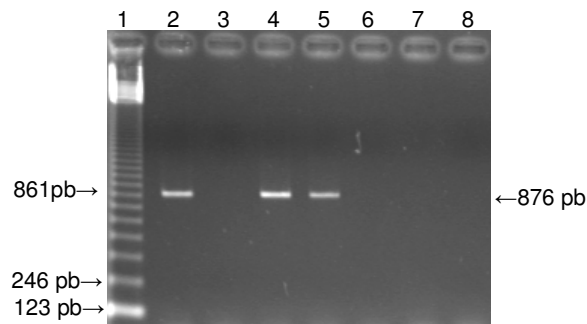


Figura 9: RT-PCR para genótipo P. Eletroforese em gel de agarose do *amplicon* de 876 pb obtido por RT-PCR com iniciadores consensuais para P (4con2 / 4con3), corados com BrEt. Col 1: Padrão de PM de 123 pb; Col 2, 4 e 5: fragmento consensual de 876 pb; Col 3, 6 e 7: fragmento não observado; Col 8: controle negativo.

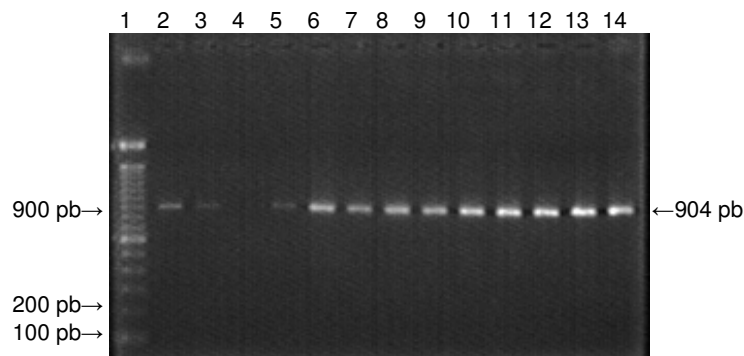


Figura 10: RT-PCR para genótipo G. Eletroforese em gel de agarose do *amplicon* de 904 pb obtido por RT-PCR com iniciadores consensuais para G (9con1 / 9con2), corados com BrEt. Col 1: Padrão de PM de 100 pb; Col 2, 3, 5-14: fragmento consensual de 904 pb; Col 4: fragmento não observado.

5.3 MULTIPLEX SEMINESTEDPCR

A determinação dos genótipos das cepas estudadas foi realizada pela pesquisa dos genótipos mais comuns, através de iniciadores específicos conforme descrito anteriormente (item 4.7.2.2) e utilizando o *amplicon* obtido pela RT-PCR como molde.

Os *amplicons* obtidos na multiplex snPCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e os fragmentos observados, comparados com aqueles esperados para os diferentes genótipos pesquisados (Figuras 11-15).

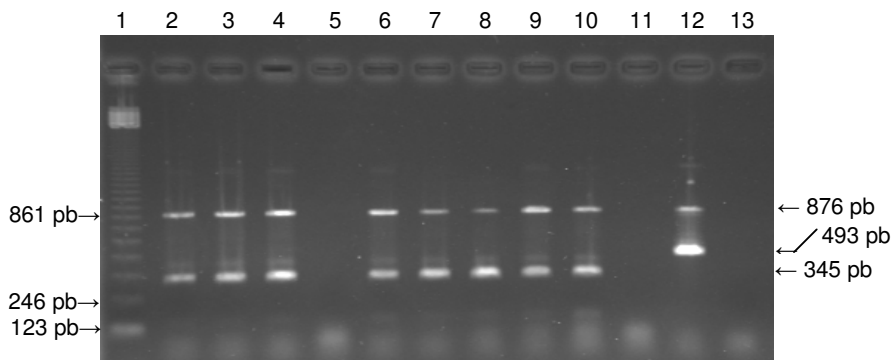


Figura 11: Multiplex snPCR com genótipos P[8] e P[4]. Eletroforese em gel de agarose do *amplicon* obtido por multiplex snPCR com iniciador consensual para P (4con3) e iniciadores específicos (P[4], P[6], P[8] e P[9]) corados com BrEt. Col 1: Padrão de PM de 123 pb; Col 2-4 e 6-10: fragmento de 345 pb correspondente ao genótipo P[8]; Col 12: fragmento de 493 pb correspondente ao genótipo P[4]; Col 5 e 11: fragmento não observado; Col 8: controle negativo. Fragmento de 876 pb corresponde ao *amplicon* consensual de P.

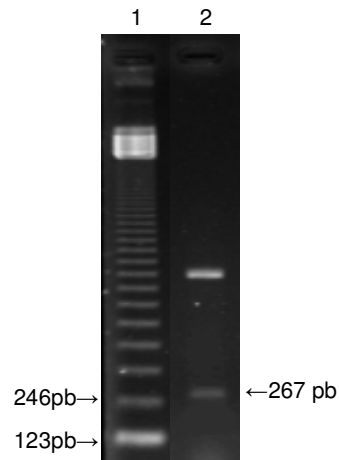


Figura 12: Multiplex snPCR com genótipo P[6]. Eletroforese em gel de agarose do *amplicon* obtido por multiplex snPCR com iniciador consensual para P (4con3) e iniciadores específicos (P[4], P[6], P[8] e P[9]) corados com BrEt. Col 1: Padrão de PM de 123 pb; Col 2: fragmento de 267 pb correspondente ao genótipo P[6].

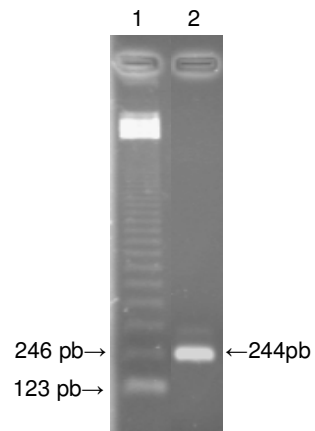


Figura 13: Monoplex snPCR com genótipo G2. Eletroforese em gel de agarose do *amplicon* obtido por multiplex snPCR com iniciador consensual para G (9con1) e iniciador específico para G2, corado com BrEt. Col 1: Padrão de PM de 123 pb; Col 2: fragmento de 244 pb correspondente ao genótipo G2.

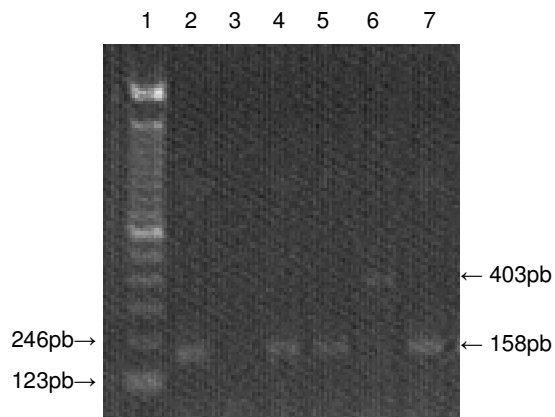


Figura 14: Multiplex snPCR com genótipos G1 e G4. Eletroforese em gel de agarose do *amplicon* obtido por multiplex snPCR com iniciador consensual para G (9con1) e iniciadores específicos (G1-G5 e G9), corados com BrEt. Col 1: Padrão de PM de 123 pb; Col 2, 4, 5 e 7: fragmento de 158 pb correspondente ao genótipo G1; Col 6: fragmento de 403 pb correspondente ao genótipo G4; Col 3: fragmento não observado.

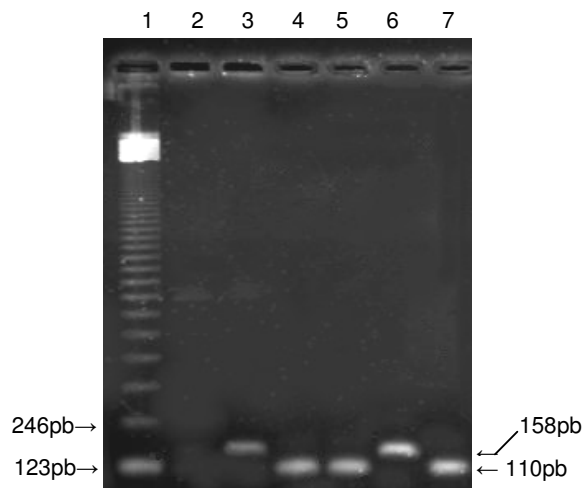


Figura 15: Multiplex snPCR com genótipos G1 e G9. Eletroforese em gel de agarose do *amplicon* obtido por multiplex snPCR com iniciador consensual para G (9con1) e iniciadores específicos (G1-G5 e G9), corados com BrEt. Col 1: Padrão de PM de 123 pb; Col 2: fragmento não observado; Col 3 e 6: fragmento de 158 pb correspondente ao genótipo G1; Col 4, 5 e 7: fragmento de 110 pb correspondente ao genótipo G9.

5.4 GENÓTIPOS DETECTADOS

5.4.1 Amostras do Pronto Socorro do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória

Noventa e seis por cento das amostras provenientes do PS do HINSG (77/80) foram tipadas tanto para G quanto para P, enquanto 3,8% (3/80) foram parcialmente tipadas, tendo somente o genótipo G determinado (Gráfico 2). O genótipo G1P[8] respondeu por 83,6% dos casos seguido por G9P[8] (7,5%), enquanto os genótipos G2 e G3 e a combinação freqüente G4P[8] não foram observados durante o período estudado (Gráfico 2).

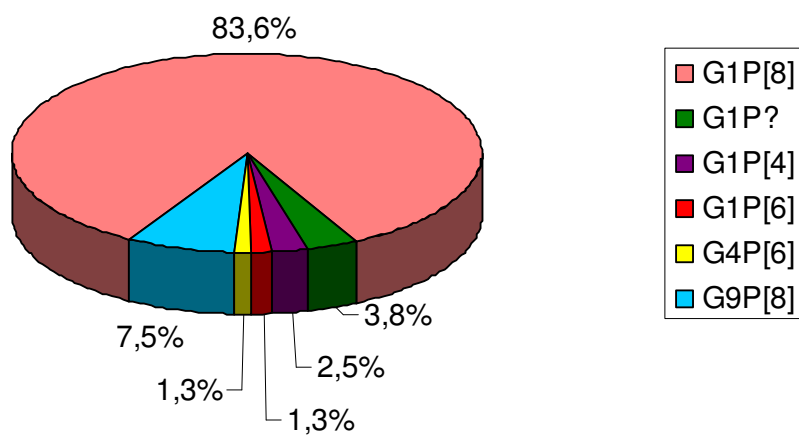


Gráfico 2: Frequências dos genótipos de RVA (n=80) provenientes do PS-HINSG.

5.4.1.1. Distribuição dos genótipos

5.4.1.1.1. *Conforme período de coleta dos espécimes*

O genótipo G1P[8] foi detectado durante todos os meses de coleta, enquanto que G9P[8] somente foi detectado a partir de abril de 2004, final do período de obtenção das amostras (Gráfico 3).

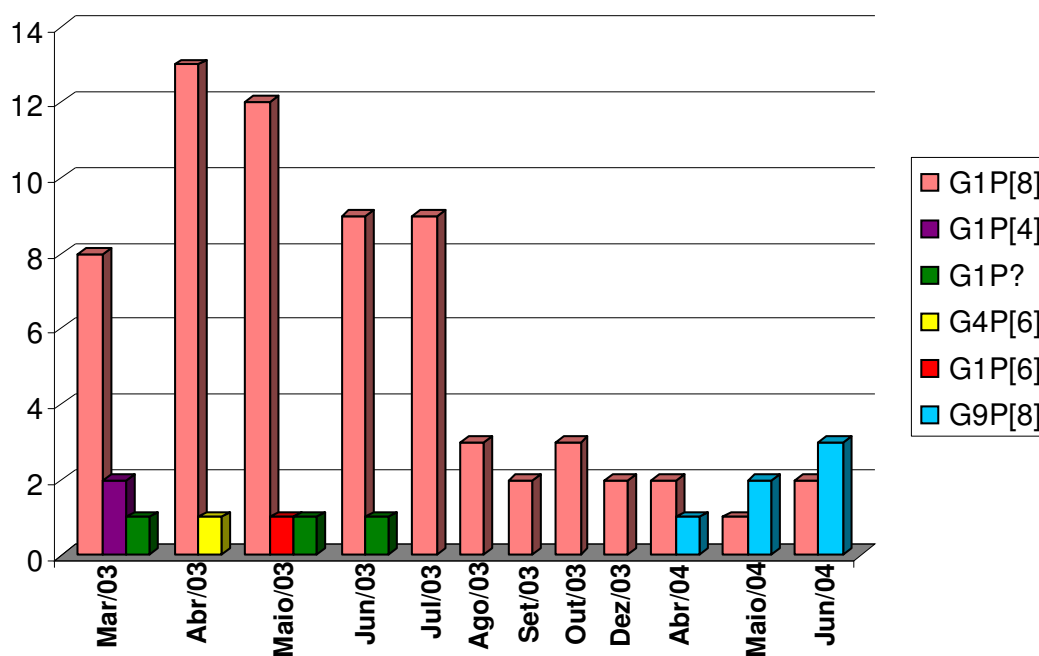


Gráfico 3: Distribuição dos genótipos de RVA das amostras provenientes do PS-HINSG, por mês de coleta.

5.4.1.1.2. *Conforme Município de origem dos espécimes*

O genótipo G1P[8] foi observado em todos os municípios que possuíam amostras positivas para RVA, enquanto o genótipo G1P[4] foi encontrado em dois municípios e G1P[6] e G4P[6] em um cada. A Figura 16 mostra a distribuição dos genótipos pelos municípios de procedência.

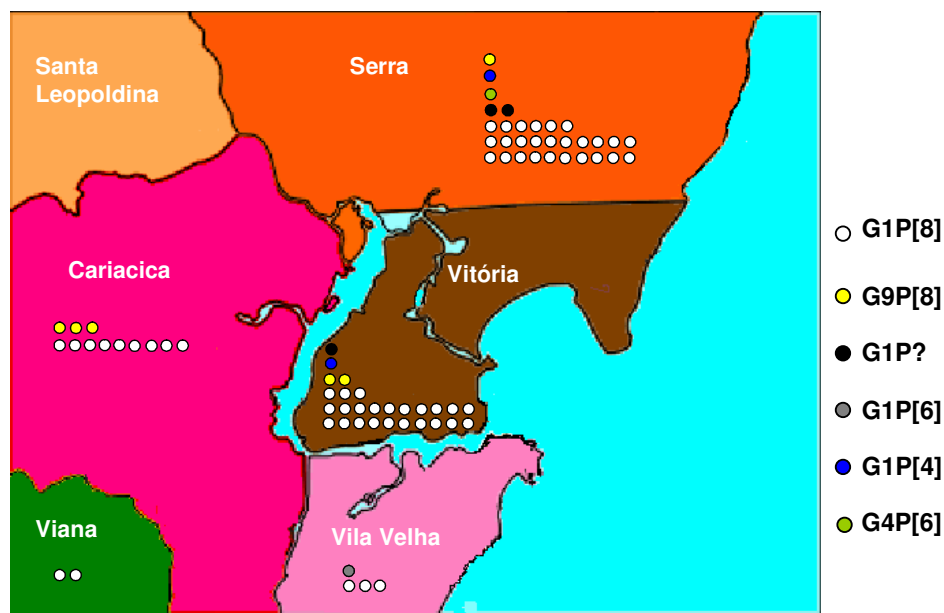


Figura 16: Mapa representativo dos municípios da Grande Vitória e os respectivos genótipos encontrados. Linhares, Guarapari, Ponto Belo e Pancas tiveram, cada um, uma amostra G1P[8]. Cada símbolo (o) representa uma cepa de RVA.

5.4.1.1.3 Conforme faixa etária

A distribuição dos diferentes genótipos de acordo com a faixa etária das crianças pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3: Distribuição dos genótipos de RVA, provenientes do PS-HINSG, de acordo com a faixa etária em meses.

Faixa etária	Genótipos (%)					
	G1P[8]	G1P[4]	G1P?	G1P[6]	G4P[6]	G9P[8]
0 – 6	16 (24)	-	01 (33,3)	01 (100)	-	-
7 – 12	22 (32,8)	-	02 (66,7)	-	01 (100)	03 (50)
13 – 24	22 (32,8)	02 (100)	-	-	-	03 (50)
25 – 36	06 (8,9)	-	-	-	-	-
> 36	01 (1,5)	-	-	-	-	-
TOTAL	67 (100)	02 (100)	03 (100)	01 (100)	01(100)	06 (100)

5.4.1.1.4 Conforme sinais e sintomas clínicos

Os genótipos G1P[8] e G9P[8] foram estratificados de acordo com os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes. Estes dados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Distribuição dos genótipos G1P[8] e G9P[8], de acordo com os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes.

Sinais e Sintomas	Genótipos		p valor*
	G1P[8] (n=67)	G9P[8] (n=06)	
Febre	52 (77%)	03 (50%)	0,13
Vômito	65 (97%)	05 (83%)	0,10
Dor abdominal	43 (64%)	02 (33%)	0,13
Anorexia	49 (73%)	05 (83%)	0,58
Desidratação	34 (51%)	02 (33%)	0,41

* determinado pelo Teste Qui-quadrado, com intervalo de confiança de 95%.

5.4.2 Amostras provenientes do CIAS/UNIMED

Noventa e três por cento das amostras (13/14) foram tipadas para G e P e uma amostra foi parcialmente tipada (Gráfico 4). Cinquenta por cento (7/14) das cepas de RVA tipadas corresponderam ao genótipo G9P[8], seguidas pelo genótipo G2P[4] em 28,7% (4/14), enquanto que uma cepa foi G1P[8] (Gráfico 4). Os genótipos G3P[8] e G4P[8], combinações freqüentes, não foram observados durante o período estudado.

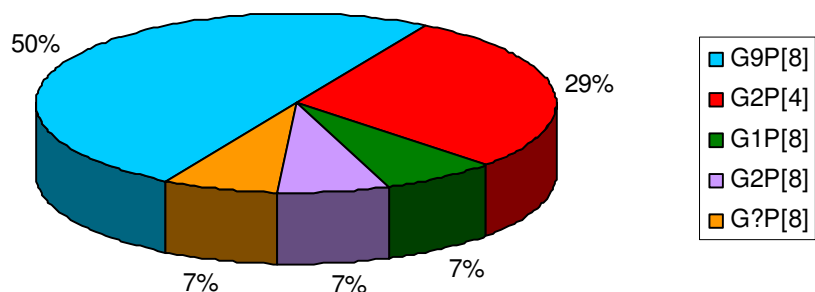


Gráfico 4: Frequências dos genótipos de RVA (n=14) provenientes do CIAS/UNIMED.

5.4.2.1 Distribuição dos genótipos

5.4.2.1.1 Conforme período de coleta dos espécimes

O genótipo G9P[8] foi detectado nos anos de 2004 e 2005 e o genótipo G2P[4] só foi observado no ano de 2006, sem a presença de G9P[8] entre as amostras estudadas neste ano (Gráfico 5).

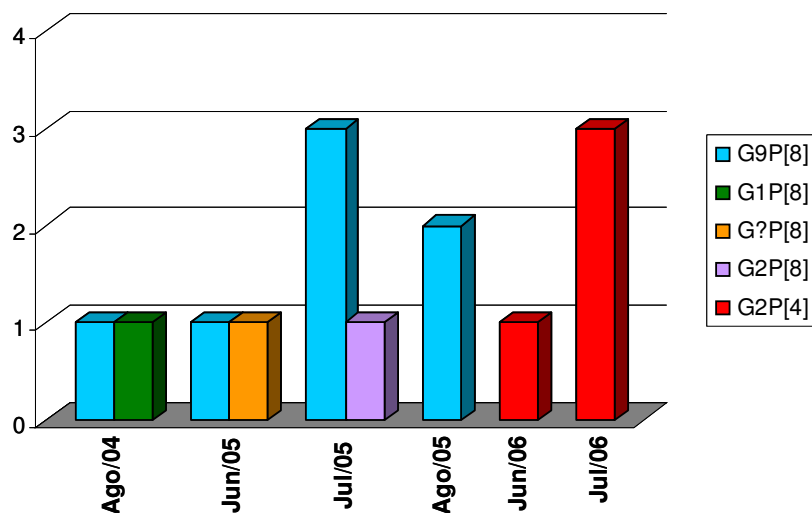


Gráfico 5: Distribuição dos genótipos de RVA das amostras provenientes do CIAS/UNIMED, por mês de coleta.

5.4.2.1.2 Conforme faixa etária

A distribuição dos diferentes genótipos de acordo com a faixa etária das crianças pode ser observada na Tabela 5.

Faixa etária	Genótipos (%)				
	G9P[8]	G1P[8]	G?P[8]	G2P[8]	G2P[4]
0 – 6	-	-	01 (100)	-	-
7 – 12	02 (28,6)	-	-	-	01 (25)
13 – 24	04 (57)	01 (100)	-	01 (100)	02 (50)
25 – 36	01 (14,4)	-	-	-	-
> 36	-	-	-	-	01 (25)
TOTAL	07 (100)	01 (100)	01 (100)	01 (100)	04 (100)

Tabela 5: Distribuição dos genótipos de RVA, provenientes do CIAS/UNIMED, por faixa etária em meses.

6 DISCUSSÃO

Os RVA são a causa mais comum de diarreia de etiologia viral em crianças até cinco anos, sendo responsáveis por cerca de um terço das hospitalizações e um quarto das mortes infantis por doença diarreica (WHO, 2000; Parashar *et al*, 2006).

Diante da importância desta infecção em todo o mundo e devido à limitação no controle através de medidas de higiene e de saneamento básico, o desenvolvimento de uma vacina eficaz e segura tornou-se necessário. Diversas vacinas vêm sendo desenvolvidas e duas já se encontram licenciadas para uso (Clark *et al*, 1996, 2004; Bernstein *et al*, 1999; Salinas *et al*, 2005; Ruiz-Palacios *et al*, 2006). Estas vacinas baseiam-se nos princípios de imunidade protetora gerada por infecção prévia que pode ser sorotipo-específica ou heterotípica (Velasquez *et al*, 1996; Estes, 2001).

Se for considerado que anticorpos neutralizantes sorotipo-específicos possuem importante papel na proteção contra diarreia causada pelos RVA, a eficácia de uma determinada vacina pode variar de acordo com os genótipos circulantes em uma dada região geográfica e em determinado tempo (Santos & Hoshino, 2005). No Brasil, a vacina monovalente Rotarix[®] (G1P[8]) foi licenciada em 2005, estando disponível em clínicas particulares e, em março de 2006, passou a fazer parte do calendário nacional de imunização infantil (Brasil, 2006).

Conforme anteriormente descrito, RVA com combinações usuais e não usuais são encontrados em diversas partes do mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, assim como em relatos de diversos estados no Brasil (Leite *et al*, 1996; Araújo *et al*, 2001, 2002; Banyai *et al*, 2005; Gentsch *et al*, 2005; Santos *et al*, 2005; Ahmed *et al*, 2006; Carmona *et al*, 2006; Carvalho-Costa *et al*, 2006; Pietruchinski *et al*, 2006, Montenegro *et al*, 2007). No Espírito Santo, no entanto, somente um estudo relatou, em encontro científico, os genótipos de RVA a partir de 52 casos de diarreia (Araújo *et al*, 2003). Logo, dado à escassez de conhecimento referente aos genótipos neste estado, este trabalho se propôs avaliar cepas/amostras fecais obtidas entre 2003 e 2006, provenientes de crianças com gastroenterite aguda, atendidas no PS-HINSG (positivas para RVA) e provenientes do CIAS/UNIMED, com o intuito de determinar o perfil genotípico das cepas circulantes na Grande Vitória, em período pré-implantação da vacina. Esse

conhecimento é de suma importância e por isso a detecção de RVA em amostras fecais e a caracterização molecular dos genótipos G e P se tornam fundamentais para o monitoramento da eficácia da vacina.

Dentre os genótipos pesquisados (G1-G4, G9 e P[4], P[6], P[8] e P[9]), os resultados obtidos demonstraram prevalência significativa do genótipo G1P[8] (83,6%) em relação aos demais detectados (16,4%) dentre as amostras obtidas do PS-HINSG, entre fevereiro de 2003 e junho de 2004. Estes resultados estão de acordo com diversos relatos da literatura, apresentados como revisão de dados, que descrevem que este genótipo é o mais prevalente no mundo, respondendo por 73% das infecções na América do Norte, por 82,4% na Austrália, por 71,6% na Europa, por 40% na América Latina ou por 34% das infecções na América do Sul e na Ásia (Castello *et al*, 2004; Santos & Hoshino, 2005).

No Brasil, G1P[8] tem sido relatado com diferentes frequências (Anexo 1), algumas destas, compatíveis com as aqui detectadas, variando de 66,6% a 86,9%, encontradas em São Paulo, Goiás e Paraná (Costa *et al*, 2004; Carmona *et al*, 2006; Pietruchinski *et al*, 2006). Leite *et al* (1996), avaliando amostras de nove estados brasileiros e do Distrito Federal, mostraram G1P[8] como responsável por 43% dos casos. No Rio de Janeiro, este genótipo foi descrito em prevalências que variaram de 39,6% a 58% das amostras, sendo também o mais prevalente nesses estudos (Araújo *et al*, 2003; Santos *et al*, 2003; Volotão *et al*, 2006; Carvalho-Costa *et al*, 2006). No Pará, alguns trabalhos também relataram o genótipo G1P[8] como o mais comum, com achados de 29% a 53% dos casos (Mascarenhas *et al*, 1998, 2002a,b). Outros estudos descrevem ainda, frequências de 20,8% em Goiás e de 31,4% em São Paulo (Souza *et al*, 2003; Carmona *et al*, 2004), também como o mais prevalente, embora em frequência semelhante ou menor do que os anteriormente citados. Entretanto, outras pesquisas, referiram o achado de G1P[8], não como o mais prevalente, em 17% das amostras no Rio de Janeiro e em 5,8%, na Bahia (Araújo *et al*, 2002; Santos *et al*, 2005).

Embora estes estudos mencionados anteriormente tenham sido realizados com amostras de diferentes origens (ambulatório, laboratórios clínicos e hospitais), revelam, claramente, a importância epidemiológica deste genótipo no Brasil e no Espírito Santo, relatados na maioria dos estudos realizados (Anexo 1). Esta ampla circulação de G1P[8], descrita em diversos países do mundo e em diversos estudos

no Brasil, em alta prevalência e de maneira contínua, pode se dever à variabilidade genética e antigênica do genótipo G1P[8], que apresenta até quatro linhagens filogenéticas distintas do gene VP7 assim como, até três linhagens filogenéticas do gene VP4 (Maunula *et al*, 1998; Iturriza-Gomara *et al*, 2000b; Araújo *et al*, 2007; Parra *et al*, 2007; Phan *et al*, 2007).

Considerando os 14 casos de RVA obtidos dentre as amostras coletadas de crianças atendidas na emergência ou hospitalizadas do CIAS/UNIMED, nos anos de 2004 a 2006, o genótipo G1P[8] foi detectado em apenas uma amostra (7,1%), correspondendo ao terceiro em prevalência. Este achado está compatível com o estudo realizado na Bahia com amostras provenientes de crianças hospitalizadas, onde este genótipo também foi o terceiro em prevalência (Santos *et al*, 2005).

O genótipo G9P[8] foi o segundo mais prevalente entre as amostras coletadas no PS-HINSG, com uma frequência de 7,5%. Vale destacar que este genótipo não foi observado dentre as amostras de 2003, período que correspondeu ao maior número de casos obtidos (90%) (Sadovsky *et al*, 2005) e a 86% das 80 cepas de RVA genotipadas (Gráfico 3). O genótipo G9P[8] foi encontrado somente entre abril e junho de 2004, final do período de coleta, correspondendo a 55% (6/11) das genotipadas naquele ano, seguido por G1P[8] com 45% (5/11).

G9 foi detectado pela primeira vez nos EUA no início dos anos 80 (Clark *et al*, 1987). Logo depois, desapareceu por cerca de uma década e reemergiu em meados dos anos 1990 e hoje é considerado o quarto genótipo mais comum mundialmente (Santos & Hoshino, 2005). No Brasil, G9 foi detectado pela primeira vez em 1997 por dois grupos de pesquisa no Rio de Janeiro, em 17% e 15,9% dos casos (Araújo *et al*, 2001; Santos *et al*, 2001). Desde então, tem sido descrito em diversos estudos no Rio de Janeiro, em São Paulo, em Goiás, na Bahia, no Paraná e em Pernambuco em frequências variando de 3,3% a 74,5% (Costa *et al*, 2004; Santos *et al*, 2005; Carmona *et al*, 2006; Carvalho-Costa *et al*, 2006; Pietruchinski *et al*, 2006; Volotão *et al*, 2006; Montenegro *et al*, 2007) (Anexo 1). No estudo realizado em 2002 no Espírito Santo, G9 correspondeu a 13% dos casos (Araújo *et al*, 2003). Isto sugere que, a partir de 2002, aparentemente, este genótipo não circulou ou circulou em números não detectáveis pelo presente estudo, retornando no ano de 2004.

Entre as amostras coletadas no CIAS/UNIMED, G9P[8] foi o genótipo mais prevalente respondendo por 50% dos casos, superando os genótipos considerados

mais comuns G1-G4 (Gentsch *et al*, 2005; Santos & Hoshino, 2005). Foi encontrado em agosto de 2004 e junho a agosto de 2005, sugerindo uma continuidade na circulação deste tipo nestes dois anos sucessivos. Entretanto, não foi detectado em 2006, embora o número de casos positivos para RVA naquele ano, tenha sido pequeno (4/28). Estes dados sugerem uma diferença no perfil de circulação deste genótipo ao longo do tempo, sendo detectado, conforme discutido anteriormente, apenas em 2004 entre as amostras do PS-HINSG e continuando a ser detectado entre as amostras do CIAS/UNIMED em 2004 e 2005.

O genótipo G9 é descrito, geralmente, associado com P[8] ou com P[6] (Santos & Hoshino, 2005). Em estudos realizados no Brasil que detectaram G9, observa-se que a combinação com P[8] foi a mais freqüente, variando de 71% a 100% dentre os casos tipados como G9, seguida pela combinação com P[6] (Araújo *et al*, 2001, 2002, Santos *et al*, 2001, 2003, 2005; Costa *et al*, 2004; Carmona *et al*, 2006; Carvalho-Costa *et al*, 2006; Pietruchinski *et al*, 2006; Volotão *et al*, 2006). Souza *et al* (2003), em estudo em Goiânia, detectaram G9P[6] como mais frequente (83%) entre as amostras de G9 e não detectaram G9P[8]. Entretanto, a combinação G9P[4] também foi observada em diversos estudos com freqüências entre 2,5% e 14% dos casos de G9 (Araújo *et al*, 2001, 2002; Santos *et al*, 2001, 2003; Carmona *et al*, 2006; Volotão *et al*, 2006). No presente, estudo G9P[8], como anteriormente demonstrado, foi a única combinação observada, apesar de também ter sido usado iniciadores para P[6] e P[4]. Entretanto, deve ser considerado que apenas 14% de todas as cepas de RVA avaliadas (PS-HINSG e CIAS) foram tipadas como G9.

O genótipo G2P[4] não foi encontrado entre as 80 cepas de RVA provenientes do PS-HINSG. Porém, foi o segundo mais prevalente nas amostras do CIAS/UNIMED, responsável por 28,7% dos casos e sendo detectado apenas no ano de 2006. Este genótipo é tido como o segundo mais prevalente no mundo (Arguelles *et al*, 2000; Laird *et al*, 2003; Fischer *et al*, 2005). No Brasil, tem sido detectado em freqüências que variaram de 0%-50% (Anexo 1). Estudos do Rio de Janeiro encontraram, entre 1996 e 1999, o genótipo G2P[4] como responsável por cerca de 20% das cepas estudadas como o primeiro (Araújo *et al*, 2001; 2002) e o segundo mais prevalente (Santos *et al*, 2003). Em 2002, foi encontrado em 25% dos casos avaliados, o segundo em prevalência (Araújo *et al*, 2003). Por outro lado, outros estudos realizados neste mesmo estado entre 2000 e 2004, não encontraram este genótipo

(Volotão *et al*, 2006; Carvalho-Costa *et al*, 2006). Estes dados sugerem uma variação na circulação deste genótipo no Rio de Janeiro. G2P[4] também foi descrito variando de 26,6% a 50% nas infecções por RVA no Pará e de 1% e 8,6% em São Paulo (Mascarenhas *et al*, 1999, 2002a, b; Carmona *et al*, 2004; 2006). O sorotipo G2 parece apresentar um padrão cíclico de ocorrência (Gusmão *et al*, 1995, 1999; Page & Steele, 2004; Luz *et al*, 2005). A detecção de G2 em nosso meio pode ser preocupante, uma vez que o ensaio clínico da vacina Rotarix[®], realizado em mais de 60.000 crianças de diversos países da América Latina e Finlândia, demonstrou uma proteção menor contra este genótipo, de 67%, em relação aos demais genótipos predominantes, que foi de 83% (Linhares & Villa, 2006).

Um fenômeno observado em diversas partes do mundo é a flutuação temporal dos genótipos de RVA. Unicomb *et al* (1999), em um estudo realizado durante 10 anos (1987-1997) em Bangladesh, demonstrou uma flutuação dos genótipos G1-G4 e G9, com co-circulação durante todo o período do estudo de G1-G4. Durante os três primeiros anos, G2 foi o sorotipo mais comum e a partir do quarto ano, G4 tornou-se o mais prevalente e permaneceu assim até 1995, quando G9 emergiu e a incidência de G4 caiu consideravelmente. Em 1996 e 1997, G9 foi o sorotipo mais prevalente naquele país (34,4% e 53%, respectivamente). Beards *et al* (1989) e Iturriza-Gomara *et al* (2000a), em estudos realizados na Inglaterra durante 10 anos (1983-1988 e 1995-1998), também demonstraram variação anual na distribuição dos sorotipos: i) G1 foi o sorotipo mais prevalente dentre o total de casos estudados, exceto em 1988; ii) G2 foi o segundo mais prevalente em 1984 e o mais prevalente em 1988; iii) em 1986, G4 emergiu como segundo mais prevalente e; iv) entre 1995 e 1996, G9 foi descrito pela primeira vez, tornando-se o quarto sorotipo mais prevalente entre 1997-1998. Sorotipos G1, G2 e G3 co-circularam durante a maioria do período de estudo.

No Brasil, alguns estudos também evidenciaram esta circulação temporal. Carmona *et al* (2006) revelaram importante variação de genótipos em São Paulo entre 1996 e 2003: i) G1P[8] esteve presente em todos os anos estudados, só não sendo o mais prevalente em 2002; ii) G2P[4] foi detectado em 1996 em 11,1% das amostras e depois desapareceu só sendo detectado em 1% em 2003; iii) G9P[8] foi encontrado pela primeira vez nessas amostras em 2000 sendo o segundo mais prevalente e em 2002 tornou-se o genótipo mais detectado; iv) G3P[8] só foi detectado em 2002 em

4,8% das amostras e; v) G4P[8] foi encontrado como segundo mais prevalente entre 1997 e 1999 e em 2001 (Anexo 1). Santos *et al* (2003) e Volotão *et al* (2006) em estudos realizados no Rio de Janeiro entre 1997 e 2004, mostraram que: i) G1P[8] esteve presente em todo o período, só não sendo o mais prevalente em 2001; ii) G2P[4] foi encontrado entre 1997 e 1999 não sendo detectado posteriormente; iii) G3P[8] foi detectado em 1997 em 23% das amostras e em 1998 em 5,8%, não sendo mais encontrado nos anos seguintes; iv) G4P[8] foi detectado entre 1998 e 2000 e em 2002, sendo o segundo mais prevalente em 2000 e; v) G9 P[8] foi encontrado durante todo o período de estudo, sendo em 2001 o genótipo mais prevalente (Anexo 1). Na Bahia, estudo realizado nos anos de 1999, 2000 e 2002 mostrou a predominância de G9P[8] e ausência de circulação de G2P[4] e de G3P[8] e baixa detecção de G1P[8] (2,7% em 1999, 0% em 2000 e 8% em 2002) (Santos *et al*, 2005) (Anexo 1).

As diferenças observadas no presente estudo nas prevalências dos genótipos G1P[8], G9P[8] e G2P[4] dos dois locais estudados, poderia ser explicada pela flutuação temporal anteriormente descrita, uma vez que a coleta de amostras no CIAS/UNIMED ocorreu em período posterior à coleta no PS-HINSG. Como discutido anteriormente, G9P[8], detectado apenas no final do período de coleta do HINSG (abril-junho 2004), foi predominante dentre as amostras do CIAS (agosto 2004-junho-agosto 2005); e ainda, o genótipo G2P[4], só foi detectado em 2006, entre as crianças hospitalizadas. Essas diferenças observadas na prevalência entre os genótipos detectados nas crianças hospitalizadas e não hospitalizadas, pode também ser justificada por perfis distintos de virulência entre as cepas de RVA. Desta maneira, cepas mais virulentas poderiam ser responsáveis pelos casos de hospitalização, enquanto que cepas menos virulentas estariam associadas a casos mais brandos, que seriam resolvidos com atendimento ambulatorial. As amostras do HINSG foram obtidas de crianças no PS e as amostras do CIAS/UNIMED foram obtidas, na sua maioria, de crianças hospitalizadas, possivelmente com quadro mais grave. Entretanto, apesar de não ter sido dado segmento das crianças do HINSG, 50% delas foram tratadas com terapia endovenosa, para reposição de líquidos e eletrólitos, sugerindo maior gravidade da doença em metade dos casos estudados (Sadovsky *et al*, 2005). Além disso, vômito, febre, anorexia, dor abdominal e desidratação foram observados em 95%, 76%, 68%, 61% e 49% das crianças

infectadas com RVA, respectivamente (Sadovsky *et al*, 2005). Deve ser considerado que quadros clínicos mais graves comumente são os que ocorrem ao PS-HINSG, que de outro modo seriam cuidados nas Unidades Básicas de Saúde (UBS). Isto pode ser evidenciado com relação aos únicos estudos de prevalência de RVA no município de Vitória ou da região metropolitana de Vitória realizada no mesmo período (2003-2004), que revelaram RVA em 37% e em 7%, em estudo baseados em PS e em UBS, respectivamente (Vicentini *et al*, 2004; Sadovsky *et al*, 2005).

Essa associação entre sorotipos/genótipos de RVA e a gravidade da doença, não está bem estabelecida, conforme também avaliado por Linhares *et al* (2006). Alguns trabalhos procuraram estabelecer a relação entre características da cepa causadora da infecção, como eletroferotipo, grupo e genótipo de RVA e a gravidade da doença, que foi avaliada por hospitalização, nível de desidratação, febre e vômito, dentre outros. Fruhwirth *et al* (2000) descreveram que não há diferença significativa na distribuição dos genótipos G e P entre pacientes ambulatoriais, hospitalizados ou com infecções nosocomiais na Áustria. Polanco-Marin *et al* (2003) encontraram dado semelhante em um estudo realizado no México, mostrando que a gravidade da diarreia não estava significativamente associada com nenhum sorotipo ou subgrupo. Nakagomi *et al* (2006) também não encontram relação entre o eletroferotipo ou o sorotipo G com a gravidade da doença.

Por outro lado, Bern *et al* (1992) reportaram, em um estudo realizado em Bangladesh, que os genótipos G2 e G3 estão associados com desidratação mais grave do que outros sorotipos G. Cascio *et al* (2001) mostraram que cepas de perfil curto e genótipo G2P[4] estavam associados com diarreia mais grave entre crianças italianas. Mota-Hernandez *et al* (2003), estudando crianças mexicanas, descreveram que a gravidade da diarreia, a frequência de desidratação e o choque hipovolêmico foram significativamente maiores em infecções com sorotipo G3 com P não tipáveis do que G3P[8] e G1P[8]. Zhang *et al* (2007) descreveram que o genótipo G1P[8] foi associado à diarreia mais grave do que a causada por G3P[8], enquanto que não observaram diferença na gravidade da infecção causada por G3P[4] e G3P[8]. Apesar deste último relato, os dados sugerem que G2 e G3 estariam associados à maior gravidade da infecção. Entretanto, Linhares *et al* (2006) observaram doença mais grave associada com o sorotipo G9. Ainda, Cascio *et al* (2001) e Mota-Hernandez *et al* (2003) especularam que a introdução de sorotipos G e P novos ou

raros na comunidade poderia resultar em infecções mais graves. Este fato foi sugerido por Rosa e Silva *et al* (2002), que observaram o genótipo incomum G3P[4], em 85,5% dos casos que necessitaram de internação e reposição de líquidos.

Portanto, esses dados anteriormente descritos, indicam que, dentre os genótipos detectados no presente estudo, G2 e G9 estariam possivelmente associados à doença mais grave. Isto poderia então justificar seus predomínios nas crianças hospitalizadas.

Como descrito anteriormente, o atendimento em PS pode sugerir que os casos teriam sido mais graves do que os relatados do estudo em UBS (Vicentini *et al*, 2004). Sob este aspecto, não haveria diferença de gravidade entre as crianças estudadas do PS-HINSG e as hospitalizadas e, as diferenças genótípicas encontradas poderiam, então, ser devido à flutuação temporal. Este fato poderia ser melhor esclarecido, comparando-se os genótipos do estudo das UBS com os do PS, realizados no mesmo período. Entretanto, nesse estudo que avaliou amostras fecais de 157 crianças com diarreia aguda provenientes de USB (Vicentini *et al*, 2004), dos 11 casos positivos para RVA, apenas uma amostra foi tipada como G1P[8] e as demais foram parcialmente tipadas (G?P[8] - dados não publicados), o que não permite relacionar os genótipos com a gravidade. Desta maneira, mais estudos seriam necessários para inferir a gravidade da infecção associada aos genótipos além da temporalidade de circulação.

Considerando os sinais e sintomas clínicos apresentados pelas crianças infectadas pelos genótipos G1P[8] e G9P[8], que foram atendidas no PS-HINSG, observou-se que as amostras G1P[8] estavam associadas com maior taxa de febre, vômito, dor abdominal e desidratação, embora estatisticamente não significantes (Tabela 04, $p > 0,05$). Entretanto, o pequeno número de amostras correspondentes a G9P[8] neste estudo não permite uma comparação adequada deste genótipo em relação às características clínicas descritas.

Além da flutuação temporal, discutida anteriormente, outro fenômeno observado na distribuição de genótipos de RVA é a flutuação geográfica. Isto pode ser exemplificado com o genótipo G8 que vem sendo descrito com alta frequência na África desde os anos 90, representando o quarto genótipo mais comum (12,8%). Entretanto, fora da África, este genótipo é raramente encontrado (Gerna *et al*, 1990; Iturriza-Gomara *et al*, 2000a; Kelkar *et al*, 2000; Bishop *et al*, 2001). Da mesma

forma, o genótipo G5, de origem suína e também encontrada em equinos, tem sido detectado em humanos somente na América do Sul, especificamente no Brasil, Paraguai e Argentina, exceto por um isolado na África (Coluchi *et al*, 2002; Esona *et al*, 2004; Santos & Hoshino, 2005). No Brasil, foi detectado pela primeira vez por Gouvea *et al* (1994), durante um estudo que avaliou cepas de diversas regiões do país e demonstraram que este genótipo vinha circulando no Brasil desde 1982. G5 continuou sendo detectado em diversas partes do país (Leite *et al*, 1996; Santos *et al*, 1998; Araújo *et al*, 2002; Mascarenhas *et al*, 2002a; 2002b; Carmona *et al*, 2004), chegando a ser responsável por 43% das infecções no ano de 1996 no Rio de Janeiro (Santos *et al*, 1998). De nosso conhecimento, a partir de 1997, este genótipo não foi mais descrito (Santos *et al*, 2001, 2003; Carmona *et al*, 2006; Carvalho-Costa *et al*, 2006; Volotão *et al*, 2006), excetuando-se o relato de apenas uma amostra no Espírito Santo em 2002 (Araújo *et al*, 2003). No presente estudo, este genótipo não foi detectado, apesar de ser sistematicamente pesquisado pela multiplex snPCR.

A estratificação dos genótipos de acordo com o município de origem das amostras obtidas do PS-HINSG (Figura 16) permitiu observar que o genótipo G9 era proveniente de crianças dos Municípios da Serra, de Vitória e de Cariacica, enquanto que o genótipo G1P[8] foi detectado em todos os municípios estudados. Porém, o pequeno número encontrado dos demais genótipos, não permite inferir sua restrição em uma determinada área geográfica.

Conforme anteriormente descrito, o RNAdf das cepas de RVA podem apresentar perfis distintos em EGPA, como longo, curto e super-curto, de acordo com a migração do 11º segmento (Estes, 2001). O perfil mais comum descrito no mundo é o longo, geralmente associados aos genótipos G1, G3 e G4 (Linhares, 2000; Arguelles *et al*, 2000; Coluchi *et al*, 2002; Ahmed *et al*, 2006; Khamrin *et al*, 2006), o único que foi observado dentre as cepas de RVA do PS-HINSG. Porém, o perfil curto foi observado em 29% dos casos avaliados do hospital CIAS/UNIMED, todos correspondendo ao genótipo G2P[4]. O perfil curto é geralmente associado ao genótipo G2 (Linhares, 2000; Estes, 2001; Arista *et al*, 2005; Amarilla *et al*, 2007), entretanto pode estar associado a outros genótipos como G8 (Cunliffe *et al*, 2001). Uma amostra genotipada como G2P[8] apresentou perfil longo na EGPA, que pode corresponder a evento de reestruturação entre distintas cepas. Deve ser levado em

consideração que o segmento que classifica o perfil eletroforético não é o mesmo que classifica os genótipos.

Genótipos incomuns são comumente relatados nos estudos de genotipagem de RVA, e correspondem àqueles G e/ou P não descritos normalmente em humanos ou quando ocorre uma combinação não usual entre genótipos G e P comuns (Estes, 2001). Entre as amostras do PS-HINSG, os genótipos incomuns detectados foram G1P[4] (2,5%, 2/80), combinação incomum entre genótipos G e P comuns; G1P[6] e G4P[6] (1,3% cada, 1/80), combinação de genótipos G comuns com genótipo P incomum. Entre as amostras do hospital CIAS/UNIMED, apenas uma amostra apresentou genótipo com combinação incomum, G2P[8]. Estudos de seqüenciamento demonstram que estas combinações incomuns parecem ocorrer por “reestruturação” entre cepas humanas comuns durante infecções mistas e também podem surgir de “reestruturações” com genótipos incomuns, ou ainda com cepas animais (Santos *et al*, 1999; Zao *et al*, 1999; Varghese *et al*, 2004). Genótipos incomuns podem ainda ser transmitidos diretamente de cepas animais para o homem (Iturriza-Gomara *et al*, 2001; Santos & Hoshino 2005; Matthijssens *et al*, 2006). Santos & Hoshino (2005) relataram que combinações consideradas não usuais foram responsáveis por 4,9% de todos os isolados revisados do mundo. A presença de genótipos incomuns tem sido descrita também no Brasil em frequência variando de 1,6% a 45% (Leite *et al*, 1996; Mascarenhas *et al*, 1998, 1999, 2000a,b; Santos *et al*, 1998; Cardoso *et al*, 2000; Araújo *et al*, 2001, 2002, 2003; Rosa e Silva *et al*, 2002; Santos *et al*, 2003; Souza *et al*, 2003; Carmona *et al*, 2004, 2006; Costa *et al*, 2004; Pietruchinski *et al*, 2006, Volotão *et al*, 2006; Montenegro *et al*, 2007). A porcentagem encontrada neste estudo é semelhante à descrita no trabalho de revisão mencionado anteriormente e a alguns dos trabalhos do Brasil (Anexo 1). Por outro lado, reestruturações “silenciosas” podem ocorrer com todos os outros segmentos do genoma viral, que não os que codificam VP4 e VP7, comumente pesquisados.

A amostra com genótipo incomum G1P[4], encontrada em 2,5% das amostras deste estudo, tem sido descrita em diversos estados brasileiros com diferentes frequências. Foi responsável por 2,4% a 18% em Belém do Pará (Mascarenhas *et al*, 1998; 2002a,b), por 1% das infecções em Minas Gerais (Rosa e Silva *et al*, 2002) e por 8,6% e 1,8% das amostras de São Paulo (Carmona *et al*, 2004; 2006). Esta

cepa foi descrita com freqüências de 14% e 41% (mais prevalente) na Argentina e em Detroit, respectivamente (Arguelles *et al*, 2000; Abdel-Haq *et al*, 2003).

G4P[6], detectado em uma amostra (1,3%) neste estudo, já havia sido descrito anteriormente no Brasil, sendo detectado em 3% e 4% das amostras avaliadas no Rio de Janeiro (Araújo *et al*, 2001; 2002) e em 4,8% em Belém do Pará (Mascarenhas *et al*, 2002a).

G1P[6], responsável por 1,3% das infecções neste estudo, tem sido descrito em diversos estudos no Brasil, com freqüências entre 0,3% em São Paulo (Carmona *et al*, 2006) e 10,8% em Goiás (Souza *et al*, 2003). Também foi detectado em 0,8% no Rio de Janeiro (Volotão *et al*, 2006), 4,8% no Pará (Mascarenhas *et al*, 2002a) e em 5,6% outra pesquisa realizada em Goiás (Costa *et al*, 2004). Estes dados indicam uma baixa freqüência desse genótipo no Sudeste, como encontrado neste estudo, e uma prevalência maior no Centro-Oeste e Norte do país. O genótipo P[6] tem sido freqüentemente associado com infecções neonatais e foi inicialmente associado a infecções assintomáticas, sugerindo tratar-se de cepas avirulentas (Hoshino *et al*, 1985). Entretanto, este genótipo tem sido associado a infecções sintomáticas em crianças e especialmente na África onde ocorre com alta freqüência e também no Brasil (Timenestky *et al*, 1994; Adah *et al*, 1997; Cunliffe *et al*, 1999; Araújo *et al*, 2001; Bok, *et al*, 2001). Neste estudo, entre as amostras do PS-HINSG, as cepas P[6] ocorreram em dois pacientes com diarreia com quatro e 11 meses, demonstrando mais uma vez seu achado em infecções sintomáticas.

A estratificação dos genótipos detectados nas amostras provenientes do PS-HINSG de acordo com a faixa etária permitiu observar que o genótipo G1P[8] ocorreu em todas as faixas consideradas, e que G9 ocorreu apenas em crianças maiores de seis meses. Entretanto, o pequeno número de casos com este genótipo não permite inferir seu papel na infecção entre os menores de seis meses. A estratificação também foi realizada entre as amostras do CIAS e novamente G9 só foi detectado em crianças com mais de seis meses. Contudo, entre as amostras do CIAS, apenas uma amostra positiva foi encontrada em paciente menor de seis meses tornando a interpretação deste resultado limitada.

O genótipo G2P[8] tem sido descrito no Brasil com freqüências de 1% a 28,6% (Mascarenhas *et al*, 1999; 2002a; Araújo *et al*, 2001, 2002; Souza *et al*, 2003; Santos *et al*, 2003).

Os genótipos G8 e G10, que não são normalmente encontrados em humanos, foram descritos pela primeira vez no Brasil em 1997 (Santos *et al*, 1998). A frequência de detecção de G8 como patógeno humano é baixa. Após a primeira descrição, este genótipo foi encontrado em outros estudos no Rio de Janeiro, no Paraná e no Recife (Volotão *et al*, 2006; Pietruchinski *et al*, 2006; Montenegro *et al*, 2007). G10 é detectado freqüentemente nos bovinos e o primeiro achado em humanos ocorreu em 1992 na Inglaterra (Beards *et al*, 1992). Outros trabalhos também apontam a presença de G10 no Rio de Janeiro com freqüências entre 0,8 e 6% (Araújo *et al*, 2001, 2002; Volotão *et al*, 2006). Neste estudo não foram utilizados iniciadores para a pesquisa destes genótipos, visto que todas as cepas deste estudo provenientes do PS-HINSG tiveram genótipo G determinado. Caso estivessem presentes, responderiam por infecções mistas.

O genótipo G12 foi detectado pela primeira vez em 1987 e depois não foi mais encontrado até 1998. Nos últimos anos, G12 tem sido descrito na Ásia, Europa, América do Sul e América do Norte sugerindo uma possível emergência deste genótipo em todo o mundo (Taniguchi *et al*, 1990; Griffin *et al*, 2002; Pongsuwanna *et al*, 2002; Das *et al*, 2003; Shinozaki *et al*, 2004; Castello *et al*, 2006; Samajdar *et al*, 2006; Bányai *et al*, 2007; Rahman *et al*, 2007a, b; Steyer *et al*, 2007). No Brasil, foi encontrado pela primeira vez em 2004 em uma amostra no Paraná durante um estudo com crianças hospitalizadas e não hospitalizadas (Pietruchinski *et al*, 2006). A cepa G12P[9] foi detectada em um paciente com 11 meses e que não estava hospitalizado. O genótipo P[9] que também é incomum já havia sido descrito no Brasil anteriormente (Leite *et al*, 1996; Santos *et al*, 2003; Volotão *et al*, 2006). Neste estudo não foram utilizados iniciadores para o genótipo G12 não permitindo a sua detecção; enquanto que P[9], embora sistematicamente pesquisado pela multiplex snPCR, não foi encontrado em nenhuma amostra.

Três amostras não puderam ser tipadas para P (4%) das amostras coletadas no PS-HINSG e uma amostra não pode ser tipada para G dentre as do CIAS/UNIMED. A ocorrência de cepas completamente ou parcialmente não tipadas tem sido reportado em quase todos os estudos epidemiológicos realizados pelo mundo, independente da metodologia empregada (Fischer *et al*, 2000; Trabelsi *et al*, 2000; Cunliffe *et al*, 2001; Coluchi *et al*, 2002; Laird *et al*, 2003). No Brasil, cepas não tipáveis foram descritas em 4% a 17,3% dos casos estudados (Leite *et al*, 1996; Mascarenhas *et al*,

1999; Araújo *et al*, 2002; Santos *et al*, 2003; 2005; Carmona *et al*, 2004; Volotão *et al*, 2006; Pietruchinski *et al*, 2006). A não determinação dos tipos P ou G pode ser devido a uma série de fatores como: i) mutações pontuais (*antigenic drift*) no sítio de hibridização do iniciador (Iturriza-Gomara *et al*, 2000b), ii) “reestruturações” (*antigenic shift*), iii) rearranjos ou recombinações intragênicas gerando cepas incomuns, não pesquisadas na rotina ou ainda não descritas (Santos & Hoshino, 2005). Iturriza-Gomara *et al* (2000b) e Martella *et al* (2004) descreveram acúmulo de mutações pontuais no sítio de ligação dos iniciadores nos genes *VP4* e *VP7*, impedindo a caracterização dos genótipos P ou G, respectivamente. O desenvolvimento e utilização de novos iniciadores, específicos ou degenerados, capazes de identificar genótipos incomuns ou que apresentem mutações ou sequenciamento das amostras indeterminadas são ferramentas que podem ser utilizadas para determinação destes genótipos (Leite *et al*, 1996; Iturriza-Gomara *et al*, 2000b; 2004; Castello *et al*, 2004; Martella *et al*, 2004).

Infecções mistas, constituídas por diferentes genótipos G e/ou P de RVA são comumente relatadas em regiões subdesenvolvidas ou em desenvolvimento, que as descrevem em uma frequência de 3,2% a 21,4% (Arguelles *et al*, 2000; Cunliffe *et al*, 2001; Coluchi *et al*, 2002; Bányai *et al*, 2005; Fischer *et al*, 2005; Ahmed *et al*, 2006). Entretanto, infecções mistas não foram observadas neste estudo. Essa aparente ausência de infecção mista está em conformidade com outros relatos do Brasil que pesquisaram os genótipos G1-G5, G9, P[4], P[6], P[8] e P[9], compatível com os pesquisados neste estudo (Cardoso *et al*, 2000; Mascarenhas *et al*, 2002b; Souza *et al*, 2003). O uso de iniciadores para outros genótipos poderia revelar infecção mista, caso presente. Entretanto, Pietruchinski *et al*, (2006), embora tenham utilizado três grupos diferentes de iniciadores contendo tipos incomuns como G6, G8, G10 e G11 também não encontraram nenhuma infecção mista no Paraná. No Brasil, essas infecções são comumente descritas. Leite *et al* (1996) relataram infecção mista em 21% dos casos em um estudo que avaliou amostras obtidas de nove estados brasileiros e do Distrito Federal. No Rio de Janeiro foram descritas taxas de 1,6% a 16% com amostras como G3P[4+8], G4P[4+8], G1+G2P[8+4], G1+G3P?, G1+G9 P[8+6] (Santos *et al*, 1998, 2003; Araújo *et al*, 2001, 2002; Volotão *et al*, 2006). Em Minas Gerais, infecção mista foi descrita em 44% dos casos analisados com combinações como G3+G8 P[4], G3+G8+G9P[4], G3P[4+8] (Rosa e Silva *et al*,

2002). Na Bahia foi detectada infecção mista com G1 e G9 (Santos *et al*, 2005); em São Paulo foi descrito em 2,8 % e 2,4% com combinações G2+G5P[8], G1+G9, G2+G3 e G4+G9 (Carmona *et al*, 2004, 2006). É importante ressaltar que alguns dos estudos pesquisaram genótipos como G6, G8, G10, G11, P[1], P[5], P[7], P[10] e P[11], além dos pesquisados neste trabalho, o que propicia a detecção de infecções mistas. Logo, a pesquisa desses outros genótipos poderia ter evidenciado infecção mista no presente estudo. Porém, as infecções mistas relatadas anteriormente ocorreram, em sua maioria, entre genótipos comuns que foram pesquisados neste estudo.

Segundo Santos & Hoshino (2005), infecções mistas têm sido detectadas na América do Sul, Ásia, África, América do Norte, Austrália e Europa em frequências de aproximadamente 15%, 12%, 10%, 4,8%, 2,3% e 1,8%, respectivamente. A presença de infecções mistas é importante por propiciar a ocorrência de “reestruturações” e desta forma, ser responsável pela diversidade genotípica dos RVA. Este fato tem especial importância quando relacionado com a eficácia das vacinas anti-RVA, que podem não proteger adequadamente contra novas cepas.

A vacina Rotarix[®] passou a fazer parte do PNI no Brasil em março de 2006, portanto, parte do período de coleta das amostras do CIAS ocorreu simultaneamente com a vacinação. Duas crianças já haviam sido vacinadas e tiveram suas amostras negativas. Como descrito anteriormente, a primeira dose da vacina precisa ser administrada até o terceiro mês de vida. A infecção sintomática pelos RVA é menos comum até os seis meses de vida possivelmente devido à proteção conferida pela amamentação ou à imaturidade intestinal (Yolken *et al*, 1992).

O presente estudo, realizado com amostras coletadas em período anterior a implantação da vacina no Brasil e em nosso Estado, demonstrou a predominância do genótipo G1P[8]. Dessa forma, sugere que a vacina implementada (Rotarix[®] G1P[8]) deverá ter uma resposta satisfatória em proteger as crianças imunizadas contra diarreia aguda grave, uma vez que a proteção contra esta cepa é de mais de 90%, conforme demonstrado em um amplo estudo realizado na América Latina e na Finlândia (Ruiz-Palacios *et al*, 2006). Entretanto, a cepa G2P[4] e cepas não usuais para as quais a vacina possui proteção menor, também foram encontradas. Com o uso da vacina, a imunidade gerada poderá levar à seleção de cepas para as quais a vacina apresenta menor resposta, como G2P[4], que foi o único genótipo detectado

nas amostras obtidas em 2006 do CIAS-UNIMED. Estes dados revelam a necessidade de vigilância contínua de genótipos de RVA em crianças com gastroenterite, hospitalizadas ou não.

7.1 CONCLUSÕES

- A prevalência de RVs entre as crianças hospitalizadas no CIAS/UNIMED foi compatível com outros estudos realizados no Brasil e os perfis curto e longo foram detectados;
- G1P[8] foi o genótipo mais prevalente nas amostras do PS-HINSG, seguido pelo genótipo G9P[8];
- Enquanto, nas amostras do PS-HINSG, o genótipo G1P[8] foi encontrado em todos os meses do estudo, o genótipo G9P[8] foi detectado somente entre abril e junho de 2004, correspondente ao final do período de coleta;
- Nas amostras do CIAS/UNIMED, somente RVs do grupo A foram detectados; G9P[8] foi o genótipo mais prevalente, seguido do genótipo G2P[4] que ocorreu apenas no ano de 2006;
- Os genótipos ou as combinações incomuns G1P[6], G1P[4], G4P[6] e G2P[8] foram encontrados em baixa prevalência neste estudo;
- Não foram encontradas infecções mistas entre as amostras estudadas;
- A detecção do genótipo G9 somente no final do período de coleta das amostras no PS-HINSG e o seu predomínio entre as amostras coletadas no CIAS/UNIMED sugere diferença temporal na circulação deste genótipo;
- Alta percentagem das cepas de RVA deste estudo foram completamente tipadas sugerindo que a metodologia empregada foi eficiente em determinar os genótipos circulantes na Grande Vitória.

7.2 PERSPECTIVAS

- O seqüenciamento dos genes VP4 e VP7 das amostras parcialmente tipadas, poderá definir o genótipo do RVA;
- Realizar hibridização ou sequenciamento da cepa genotipada como G2P[8], do segmento 11 que apresentou perfil eletroforético longo, para determinar sua origem;
- Sequenciamento de genes do RVA, que não *VP4* e *VP7*, poderão detectar eventos de reestruturação “silenciosa” entre cepas de RVA e a sua dimensão.

8 REFERÊNCIAS

- Abdel-Haq NM, Thomas RA, Asmar BI, Zacharova V, Lyman WD. Increased prevalence of G1P[4] genotype among children with rotavirus-associated gastroenteritis in metropolitan Detroit. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(6):2680-2.
- Abid I, Guix S, Aouni M, Pinto R, Bosch A. Detection and characterization of human group C rotavirus in the pediatric population of Barcelona, Spain. *J Clin Virol.* 2007; 38(1):78-82.
- Adah MI, Rohwedder A, Olaleye OD, Werchau H. Nigerian rotavirus serotype G8 could not be typed by PCR due to nucleotide mutation at the 3' end of the primer binding site. *Arch Virol.* 1997; 142(9):1881-7.
- Ahmed MU, Kobayashi N, Wakuda M, Sanekata T, Taniguchi K, Kader A, Naik TN, Ishino M, Alam MM, Kojima K, Mise K, Sumi A. Genetic analysis of group B human rotaviruses detected in Bangladesh in 2000 and 2001. *J Med Virol.* 2004;72(1):149-55.
- Ahmed HM, Coulter JB, Nakagomi O, Hart CA, Zaki JM, Al-Rabaty AA, Dove W, Cunliffe NA. Molecular characterization of rotavirus gastroenteritis strains, Iraqi Kurdistan. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(5):824-6.
- Aitken C, Jeffries DJ. Nosocomial spread of viral disease. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(3):528-46.
- Alfieri AA, Leite JP, Nakagomi O, Kaga E, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR. Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence. *Arch Virol.* 1996; 141(12):2353-64.
- Al-Yousif Y, Anderson J, Chard-Bergstrom C, Kapil S. Development, evaluation, and application of lateral-flow immunoassay (immunochromatography) for detection of rotavirus in bovine fecal samples. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9(3):723-5.
- Amarilla A, Espínola EE, Galeano ME, Fariña N, Russomando G, Parra GI. Rotavirus infection in the Paraguayan population from 2004 to 2005: high incidence of rotavirus strains with short electropherotype in children and adults. *Med Sci Monit.* 2007; 13(7):CR333-7.

Andrew ME, Boyle DB, Coupar BE, Reddy D, Bellamy AR, Both GW. Vaccinia-rotavirus VP7 recombinants protect mice against rotavirus-induced diarrhoea. *Vaccine*. 1992;10(3):185-91.

Araujo IT, Ferreira MS, Fialho AM, Assis RM, Cruz CM, Rocha M, Leite JP. Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(5):1999-2001.

Araujo IT, Fialho AM, de Assis RM, Rocha M, Galvao M, Cruz CM, Ferreira MS, Leite JP. Rotavirus strain diversity in Rio de Janeiro, Brazil: characterization of VP4 and VP7 genotypes in hospitalized children. *J Trop Pediatr*. 2002;48(4):214-8.

Araujo IT, Assis RMS, Fialho AM, Dickstein C, Carmo GMI, Moura-Junior JE, Alves RMS, Benatto MLN, Souza MPAH, Mesquita NC, Hatch DL, Leite JPG. 2003. Diversity of rotavirus genotypes recovered from children with gastroenteritis in Rio de Janeiro and Espírito Santo. XIV National Meeting of Virology, Florianópolis, SC, 233.

Araujo IT, Assis RM, Fialho AM, Mascarenhas JD, Heinemann MB, Leite JP. Brazilian P[8],G1, P[8],G5, P[8],G9, and P[4],G2 rotavirus strains: nucleotide sequence and phylogenetic analysis. *J Med Virol*. 2007; 79(7):995-1001.

Arias CF, Lopez S, Mascarenhas JD, Romero P, Cano P, Gabbay YB, de Freitas RB, Linhares AC. Neutralizing antibody immune response in children with primary and secondary rotavirus infections. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1994; 1(1):89-94.

Arguelles MH, Villegas GA, Castello A, Abrami A, Ghiringhelli PD, Semorile L, Glikmann G. VP7 and VP4 genotyping of human group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(1):252-9.

Arista S, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C, Martella V, Cascio A, Iturriza-Gomara M. G2 rotavirus infections in an infantile population of the South of Italy: variability of viral strains over time. *J Med Virol*. 2005; 77(4):587-94.

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

Banyai K, Gentsch JR, Schipp R, Jakab F, Meleg E, Mihaly I, Szucs G. Dominating prevalence of P[8],G1 and P[8],G9 rotavirus strains among children admitted to

hospital between 2000 and 2003 in Budapest, Hungary. *J Med Virol.* 2005; 76(3):414-23.

Banyai K, Bogdan A, Kisfali P, Molnar P, Mihaly I, Melegh B, Martella V, Gentsch JR, Szucs G. Emergence of serotype G12 rotaviruses, Hungary. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13(6):916-9.

Barman P, Ghosh S, Samajdar S, Mitra U, Dutta P, Bhattacharya SK, Krishnan T, Kobayashi N, Naik TN. RT-PCR based diagnosis revealed importance of human group B rotavirus infection in childhood diarrhoea. *J Clin Virol.* 2006; 36(3):222-7.

Barro M, Patton JT. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(11):4114-9.

Beards GM, Bryden AS. Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay test for rotavirus antigen in faeces. *J Clin Pathol.* 1981; 34(12):1388-91.

Beards GM, Campbell AD, Cottrell NR, Peiris JS, Rees N, Sanders RC, Shirley JA, Wood HC, Flewett TH. Enzyme-linked immunosorbent assays based on polyclonal and monoclonal antibodies for rotavirus detection. *J Clin Microbiol.* 1984; 19(2):248-54.

Beards GM, Desselberger U, Flewett TH. Temporal and geographical distributions of human rotavirus serotypes, 1983 to 1988. *J Clin Microbiol.* 1989 Dec;27(12):2827-33.

Beards G, Xu L, Ballard A, Desselberger U, McCrae MA. A serotype 10 human rotavirus. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(6):1432-5.

Bern C, Unicomb L, Gentsch JR, Banul N, Yunus M, Sack RB, Glass RI. Rotavirus diarrhea in Bangladeshi children: correlation of disease severity with serotypes. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(12):3234-8.

Bernstein DI, Sack DA, Rothstein E, Reisinger K, Smith VE, O'Sullivan D, Spriggs DR, Ward RL. Efficacy of live, attenuated, human rotavirus vaccine 89-12 in infants: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 1999; 354(9175):287-90. Links

Bhan MK, Lew JF, Sazawal S, Das BK, Gentsch JR, Glass RI. Protection conferred by neonatal rotavirus infection against subsequent rotavirus diarrhea. *J Infect Dis.* 1993; 168(2):282-7.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*. 1973; 2(7841):1281-3.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet*. 1974; 1(7849):149-51.

Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E, Lund JS. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *N Engl J Med*. 1983; 309(2):72-6.

Bishop RF, Masendycz PJ, Bugg HC, Carlin JB, Barnes GL. Epidemiological patterns of rotaviruses causing severe gastroenteritis in young children throughout Australia from 1993 to 1996. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(3):1085-91.

Bok K, Palacios G, Sijvarger K, Matson D, Gomez J. Emergence of G9 P[6] human rotaviruses in Argentina: phylogenetic relationships among G9 strains. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(11):4020-5.

Bon F, Fromantin C, Aho S, Pothier P, Kohli E. G and P genotyping of rotavirus strains circulating in France over a three-year period: detection of G9 and P[6] strains at low frequencies. The AZAY Group. *J Clin Microbiol*. 2000;38(4):1681-3.

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. *J Clin Microbiol*. 1990; 28(3):495-503.

Boulikas T, Hancock R. A highly sensitive technique for staining DNA and RNA in polyacrylamide gels using silver. *J Biochem Biophys Methods*. 1981; 5(4):219-28.

Boyle JF, Holmes KV. RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *J Virol*. 1986; 58(2):561-8.

Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Thomas L, Yolken RH, Arrobio JO, Kapikian AZ, Parrott RH, Chanock RM. Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy, and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. *J Clin Microbiol*. 1981; 13(5):976-81.

Brandt CD, Arndt CW, Evans GL, Kim HW, Stallings EP, Rodriguez WJ, Parrott RH. Evaluation of a latex test for rotavirus detection. *J Clin Microbiol*. 1987; 25(9):1800-2.

Brasil. Ministério da Saúde. Informe Técnico Doença Diarréica por Rotavírus: Vigilância Epidemiológica e Prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus Humano – VORH. Brasília, 2006.

Bresee JS, Parashar UD, Widdowson MA, Gentsch JR, Steele AD, Glass RI. Update on rotavirus vaccines. *Pediatr Infect Dis J*. 2005; 24(11):947-52.

Brussow H, Werchau H, Lerner L, Mietens C, Liedtke W, Sidoti J, Sotek J. Seroconversion patterns to four human rotavirus serotypes in hospitalized infants with acute rotavirus gastroenteritis. *J Infect Dis*. 1988; 158(3):588-95.

Brussow H, Sidoti J, Barclay D, Sotek J, Dirren H, Freire WB. Prevalence and serotype specificity of rotavirus antibodies in different age groups of Ecuadorian infants. *J Infect Dis*. 1990; 162(3):615-20.

Bugarcic A, Taylor JA. Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 is secreted from the apical surfaces of polarized epithelial cells. *J Virol*. 2006; 80(24):12343-9

Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science*. 1996; 272(5258):104-7.

Castello AA, Arvay ML, Glass RI, Gentsch J. Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 Oct;23(10 Suppl):S168-72.

Castello AA, Arguelles MH, Rota RP, Olthoff A, Jiang B, Glass RI, Gentsch JR, Glikmann G. Molecular epidemiology of group A rotavirus diarrhea among children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and emergence of the infrequent genotype G12. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(6):2046-50.

Cardoso das D, Soares CM, Azevedo MS, Leite JP, Munford V, Racz ML. Serotypes and subgroups of rotavirus isolated from children in central Brazil. *J Health Popul Nutr*. 2000; 18(1):39-43.

Cardoso DD, Racz ML, Azevedo MS, Martins RM, Soares CM. Genotyping of group A rotavirus samples from Brazilian children by probe hybridization. *Braz J Med Biol Res*. 2001; 34(4):471-3.

Cardoso DD, Soares CM, Dias e Souza MB, de Azevedo Mda S, Martins RM, Queiroz DA, de Brito WM, Munford V, Racz ML. Epidemiological features of rotavirus

infection in Goiania, Goias, Brazil, from 1986 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98(1):25-9.

Carmona RC, Timenetsky Mdo C, da Silva FF, Granato CF. Characterization of rotavirus strains from hospitalized and outpatient children with acute diarrhoea in Sao Paulo, Brazil. *J Med Virol.* 2004; 74(1):166-72.

Carmona RC, Timenetsky Mdo C, Morillo SG, Richtzenhain LJ. Human rotavirus serotype G9, Sao Paulo, Brazil, 1996-2003. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(6):963-8.

Carneiro NB, Diniz-Santos DR, Fagundes SQ, Neves LL, Reges RM, Lima EK, Quadros VH, Soares LE, Silva FS, Schneider Hde G, Figueiredo I, Silva LR. Clinical and epidemiological aspects of children hospitalized with severe rotavirus-associated gastroenteritis in Salvador, BA, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2005; 9(6):525-8.

Carvalho-Costa FA, Assis RM, Fialho AM, Boia MN, Alves DP, Martins CM, Leite JP. Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101(3):291-4.

Cascio A, Vizzi E, Alaimo C, Arista S. Rotavirus gastroenteritis in Italian children: can severity of symptoms be related to the infecting virus? *Clin Infect Dis.* 2001; 15;32(8):1126-32.

Chen D, Zeng CQ, Wentz MJ, Gorziglia M, Estes MK, Ramig RF. Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. *J Virol.* 1994; 68(11):7030-9.

Clark SM, Roth JR, Clark ML, Barnett BB, Spendlove RS. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. *J Virol.* 1981; 39(3):816-22.

Clark HF, Hoshino Y, Bell LM, Groff J, Hess G, Bachman P, Offit PA. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. *J Clin Microbiol.* 1987; 25(9):1757-62.

Clark HF, Offit PA, Ellis RW, Eiden JJ, Krah D, Shaw AR, Pichichero M, Treanor JJ, Borian FE, Bell LM, Plotkin SA. The development of multivalent bovine rotavirus (strain WC3) reassortant vaccine for infants. *J Infect Dis.* 1996; 174 Suppl 1:S73-80.

Clark HF, Offit PA. Vaccines for rotavirus gastroenteritis universally needed for infants. *Pediatr Ann.* 2004; 33(8):536-43.

Cohen J, Charpilienne A, Chilmoneczyk S, Estes MK. Nucleotide sequence of bovine rotavirus gene 1 and expression of the gene product in baculovirus. *Virology* 1989; 171:131–140.

Coluchi N, Munford V, Manzur J, Vazquez C, Escobar M, Weber E, Mármol P, Rácz ML. Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of rotavirus strains in children with acute diarrhea in Paraguay. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(5):1709-14.

Costa PS, Cardoso DD, Grisi SJ, Silva PA, Fiaccadori F, Souza MB, Santos RA. [Rotavirus A infections and reinfections: genotyping and vaccine implications] *J Pediatr (Rio J).* 2004; 80(2):119-22.

Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(10):5389-94.

Crawford SE, Labbé M, Cohen J, Burroughs MH, Zhou YJ, Estes MK. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J Virol.* 1994; 68(9):5945-52.

Cunliffe NA, Gondwe JS, Broadhead RL, Molyneux 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 to 1998: predominance of novel P[6]G8 strains. *J Med Virol.* 1999; 57(3):308-12.

Cunliffe NA, Gondwe JS, Graham SM, Thindwa BD, Dove W, Broadhead RL, Molyneux ME, Hart CA. Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(3):836-43.

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 Delhi, India. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(7):1820-2.

Das S, Varghese V, Chaudhury S, Barman P, Mahapatra S, Kojima K, Bhattacharya SK, Krishnan T, Ratho RK, Chhotray GP, Phukan AC, Kobayashi N, Naik TN. Emergence of novel human group A rotavirus G12 strains in India. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(6):2760-2.

Davidson GP, Gall DG, Petric M, Butler DG, Hamilton JR. Human rotavirus enteritis induced in conventional piglets. Intestinal structure and transport. *J Clin Invest.* 1977; 60(6):1402-9.

Delmas O, Durand-Schneider AM, Cohen J, Colard O, Trugnan G. Spike protein VP4 assembly with maturing rotavirus requires a postendoplasmic reticulum event in polarized caco-2 cells. *J Virol.* 2004; 78(20):10987-94.

Eichwald C, Rodriguez JF, Burrone OR. Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *J Gen Virol.* 2004; 85(Pt 3):625-34.

Esona MD, Armah GE, Geyer A, Steele AD. Detection of an unusual human rotavirus strain with G5P[8] specificity in a Cameroonian child with diarrhea. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(1):441-4.

Espejo RT, López S, Arias C. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J Virol.* 1981; 37(1):156-60.

Estes MK, Graham DY, Mason BB. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J Virol.* 1981; 39(3):879-88.

Estes KM. Rotaviruses and Their Replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, *et al.*, eds. *Fields Virology*, ed 4. Philadelphia, Lippincott Williams &Wilkins, CD-rom; 2001.

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. *Virus Taxonomy 8th Reports of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier, 2005. Disponível em: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>). Acesso em: 02 setembro 2007.

Feng N, Burns JW, Bracy L, Greenberg HB. Comparison of mucosal and systemic humoral immune responses and subsequent protection in mice orally inoculated with a homologous or a heterologous rotavirus. *J Virol.* 1994; 68(12):7766-73. Erratum in: *J Virol* 1995 May;69(5):3246.

Fernandes JV, Fonseca SM, Azevedo JC, Maranhao Hde S, Fonseca MH, Dantas MT, Meissner Rde V. Rotavirus detection in feces of children with acute diarrhea. *J Pediatr (Rio J).* 2000; 76(4):300-4.

Fischer TK, Steinsland H, Molbak K, Ca R, Gentsch JR, Valentiner-Branth P, Aaby P, Sommerfelt H. Genotype profiles of rotavirus strains from children in a suburban community in Guinea-Bissau, Western Africa. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(1):264-7.

Fischer TK, Gentsch JR. Rotavirus typing methods and algorithms. *Rev Med Virol.* 2004; 14(2):71-82.

Fischer TK, Eugen-Olsen J, Pedersen AG, Molbak K, Bottiger B, Rostgaard K, Nielsen NM. Characterization of rotavirus strains in a Danish population: high frequency of mixed infections and diversity within the VP4 gene of P[8] strains. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(3):1099-104.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Letter: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet.* 1973; 2(7844):1497.

Fruhvirth M, Brosi S, Ellemunter H, Moll-Schuler I, Rohwedder A, Mutz I. Distribution of rotavirus VP4 genotypes and VP7 serotypes among nonhospitalized and hospitalized patients with gastroenteritis and patients with nosocomially acquired gastroenteritis in Austria. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(5):1804-6.

Fujii R, Kuzuya M, Hamano M, Ogura H, Yamada M, Mori T. Neutralization assay for human group C rotaviruses using a reverse passive hemagglutination test for endpoint determination. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(1):50-4.

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

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

Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, Jain V, Cunliffe NA, Nakagomi O, Kirkwood CD, Fischer TK, Parashar UD, Bresee JS, Jiang B, Glass RI. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis.* 2005; 192 Suppl 1:S146-59.

Gerna G, Sarasini A, Zentilin L, Di Matteo A, Miranda P, Parea M, Battaglia M, Milanesi G. Isolation in Europe of 69 M-like (serotype 8) human rotavirus strains with

either subgroup I or II specificity and a long RNA electropherotype. *Arch Virol.* 1990;112(1-2):27-40.

Glass RI, Bresee JS, Turcios R, Fischer TK, Parashar UD, Steele AD. Rotavirus vaccines: targeting the developing world. *J Infect Dis.* 2005; 192 Suppl 1:S160-6.

Glass RI, Parashar UD, Bresee JS, Turcios R, Fischer TK, Widdowson MA, Jiang B, Gentsch JR. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *Lancet.* 2006; 368(9532):323-32.

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

Gouvea V, de Castro L, Timenetsky MC, Greenberg H, Santos N. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J Clin Microbiol.* 1994 May;32(5):1408-9. Erratum in: *J Clin Microbiol* 1994; 32(7):1834.

Greenberg HB, Valdesuso J, van Wyke K, Midthun K, Walsh M, McAuliffe V, Wyatt RG, Kalica AR, Flores J, Hoshino Y. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J Virol.* 1983; 47(2):267-75.

Griffin DD, Nakagomi T, Hoshino Y, Nakagomi O, Kirkwood CD, Parashar UD, Glass RI, Gentsch JR; National Rotavirus Surveillance System. Characterization of nontypeable rotavirus strains from the United States: identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6],G12) and rare P3[9] strains related to bovine rotaviruses. *Virology.* 2002; 294(2):256-69.

Gulati BR, Deepa R, Singh BK, Rao CD. Diversity in Indian equine rotaviruses: identification of genotype G10,P6[1] and G1 strains and a new VP7 genotype (G16) strain in specimens from diarrheic foals in India. *J Clin Microbiol.* 2007 Mar;45(3):972-8.

Gurwith M, Wenman W, Hinde D, Feltham S, Greenberg H. A prospective study of rotavirus infection in infants and young children. *J Infect Dis.* 1981; 144(3):218-24.

Gusmao RH, Mascarenhas JD, Gabbay YB, Lins-Lainson Z, Ramos FL, Monteiro TA, Valente SA, Linhares AC. Rotaviruses as a cause of nosocomial, infantile diarrhoea in northern Brazil: pilot study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1995; 90(6):743-9.

Gusmao RH, Mascarenhas JD, Gabbay YB, Lins-Lainson Z, Ramos FL, Monteiro TA, Valente SA, Fagundes-Neto U, Linhares AC. Rotavirus subgroups, G serotypes, and electrophoretotypes in cases of nosocomial infantile diarrhoea in Belem, Brazil. *J Trop Pediatr.* 1999; 45(2):81-6.

Halaihel N, Lievin V, Ball JM, Estes MK, Alvarado F, Vasseur M. Direct inhibitory effect of rotavirus NSP4(114-135) peptide on the Na(+)-D-glucose symporter of rabbit intestinal brush border membrane. *J Virol.* 2000; 74(20):9464-70.(a)

Halaihel N, Lievin V, Alvarado F, Vasseur M. Rotavirus infection impairs intestinal brush-border membrane Na(+)-solute cotransport activities in young rabbits. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 279(3):G587-96. (b)

Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol.* 1982; 16(3):473-7.

Hewish MJ, Takada Y, Coulson BS. Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J Virol.* 2000; 74(1):228-36.

Hoshino Y, Sereno MM, Midthun K, Flores J, Kapikian AZ, Chanock RM. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82(24):8701-4.

Hoshino Y, Saif LJ, Sereno MM, Chanock RM, Kapikian AZ. Infection immunity of piglets to either VP3 or VP7 outer capsid protein confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. *J Virol.* 1988; 62(3):744-8.

Hughes JH, Tuomari AV, Mann DR, Hamparian VV. Latex immunoassay for rapid detection of rotavirus. *J Clin Microbiol.* 1984; 20(3):441-7.

Hung T, Chen GM, Wang CG *et al.* Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet.* 1984; 1(8387):1139-42.

International Rotavirus Symposium, 6, 2004, Mexico City. Proceedings of The Sixth International Rotavirus Symposium, 2004.

Iturriza-Gomara M, Green J, Brown DW, Desselberger U, Gray JJ. Comparison of specific and random priming in the reverse transcriptase polymerase chain reaction for genotyping group A rotaviruses. *J Virol Methods.* 1999; 78(1-2):93-103.

Iturriza-Gomara M, Green J, Brown DW, Ramsay M, Desselberger U, Gray JJ. Molecular epidemiology of human group A rotavirus infections in the United Kingdom between 1995 and 1998. *J Clin Microbiol.* 2000a; 38(12):4394-401.

Iturriza-Gomara M, Green J, Brown DW, Desselberger U, Gray JJ. Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: implications for reverse transcription-PCR genotyping. *J Clin Microbiol.* 2000b Feb;38(2):898-901.

Iturriza-Gomara M, Isherwood B, Desselberger U, Gray J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J Virol.* 2001; 75(8):3696-705.

Iturriza-Gomara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J Clin Virol.* 2004; 31(4):259-65.

Iizuka S, Tabara K, Kawamukai A, Itogawa H, Hoshina K. An outbreak of group C rotavirus infection in an elementary school in Shimane prefecture, Japan, February 2006. *Jpn J Infect Dis.* 2006; 59(5):350-1.

Jagannath MR, Kesavulu MM, Deepa R, Sastri PN, Kumar SS, Suguna K, Rao CD. N- and C-terminal cooperation in rotavirus enterotoxin: novel mechanism of modulation of the properties of a multifunctional protein by a structurally and functionally overlapping conformational domain. *J Virol.* 2006; 80(1):412-25

Jayaram H, Estes MK, Prasad BV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res.* 2004; 101(1):67-81.

Jourdan N, Maurice M, Delautier D, Quero AM, Servin AL, Trugnan G. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J Virol.* 1997; 71(11):8268-78.

Jourdan N, Brunet JP, Sapin C, Blais A, Cotte-Laffitte J, Forestier F, Quero AM, Trugnan G, Servin AL. Rotavirus infection reduces sucrase-isomaltase expression in human intestinal epithelial cells by perturbing protein targeting and organization of microvillar cytoskeleton. *J Virol.* 1998; 72(9):7228-36.

Kalica AR, Flores J, Greenberg HB. Identification of the rotaviral gene that codes for hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. *Virology.* 1983; 125:194-205.

Kalijot KT, Shaw RD, Rubin DH, Greenberg HB. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol.* 1988; 62(4):1136-44.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol.* 1972; 10(5):1075-81.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Levine MM, Yolken RH, VanKirk DH, Dolin R, Greenberg HB, Chanock RM. Oral administration of human rotavirus to volunteers: induction of illness and correlates of resistance. *J Infect Dis.* 1983; 147(1):95-106.

Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM, Perez-Schael I. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *J Infect Dis.* 1996; 174 Suppl 1:S65-72.

Kelkar SD, Ayachit VL. Circulation of group A rotavirus subgroups and serotypes in Pune, India, 1990-1997. *J Health Popul Nutr.* 2000; 18(3):163-70.

Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *J Med Virol.* 2006; 78(7):986-94.

Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Chan-it W, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Novel porcine rotavirus of genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. *Virology.* 2007; 361(2):243-52.

Kuzuya M, Fujii R, Hamano M, Yamada M, Shinozaki K, Sasagawa A, Hasegawa S, Kawamoto H, Matsumoto K, Kawamoto A, Itagaki A, Funatsumaru S, Urasawa S. Survey of human group C rotaviruses in Japan during the winter of 1992 to 1993. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(1):6-10.

Labbe M, Baudoux P, Charpilienne A, Poncet D, Cohen J. Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein. *J Gen Virol.* 1994; 75 (Pt 12):3423-30.

Laird AR, Ibarra V, Ruiz-Palacios G, Guerrero ML, Glass RI, Gentsch JR. Unexpected detection of animal VP7 genes among common rotavirus strains isolated from children in Mexico. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(9):4400-3.

Lawton JA, Zeng CQ, Mukherjee SK, Cohen J, Estes MK, Prasad BV. Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer. *J Virol*. 1997a; 71(10):7353-60.

Lawton JA, Estes MK, Prasad BV. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat Struct Biol*. 1997b; 4:118–121.

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. *Arch Virol*. 1996; 141(12):2365-74.

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

Linhares AC, Pinheiro FP, Freitas RB, Gabbay YB, Shirley JA, Beards GM. An outbreak of rotavirus diarrhea among a nonimmune, isolated South American Indian community. *Am J Epidemiol*. 1981; 113(6):703-10.

Linhares AC, Gabbay YB, Freitas RB, da Rosa ES, Mascarenhas JD, Loureiro EC. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belem, Brazil. *Epidemiol Infect*. 1989; 102(1):129-45.

Linhares AC. Rotavirus infection in Brazil: epidemiology and challenges for its control. *Cad Saude Publica*. 2000; 16(3):629-46.

Linhares AC, Mascarenhas JD, Gusmao RH, Gabbay YB, Fialho AM, Leite JP. Neonatal rotavirus infection in Belem, northern Brazil: nosocomial transmission of a P[6] G2 strain. *J Med Virol*. 2002; 67(3):418-26.

Linhares AC, Verstraeten T, Wolleswinkel-van den Bosch J, Clemens R, Breuer T. Rotavirus serotype G9 is associated with more-severe disease in Latin America. *Clin Infect Dis*. 2006; 43(3):312-4.

Linhares AC, Villa LL. Vaccines against rotavirus and human papillomavirus (HPV). *J Pediatr (Rio J)*. 2006; 82(3 Suppl):S25-34.

Liu M, Mattion NM, Estes MK. Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology*. 1992; 188(1):77-84.

Lopez T, Camacho M, Zayas M, Najera R, Sanchez R, Arias CF, Lopez S. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J Virol.* 2005; 79(1):184-92.

Lovmar L, Fock C, Espinoza F, Bucardo F, Syvänen AC, Bondeson K. Microarrays for genotyping human group A rotavirus by multiplex capture and type-specific primer extension. *J Clin Microbiol.* 2003;41(11):5153-8.

Luz CR, Mascarenhas JD, Gabbay YB, Motta AR, Lima TV, Soares Lda S, Linhares AC. Rotavirus serotypes and electropherotypes identified among hospitalised children in São Luís, Maranhão, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2005; 47(5):287-93.

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

Martella V, Terio V, Arista S, Elia G, Corrente M, Madio A, Pratelli A, Tempesta M, Cirani A, Buonavoglia C. Nucleotide variation in the VP7 gene affects PCR genotyping of G9 rotaviruses identified in Italy. *J Med Virol.* 2004; 72(1):143-8.

Martella V, Ciarlet M, Banyai K, Lorusso E, Cavalli A, Corrente M, Elia G, Arista S, Camero M, Desario C, Decaro N, Lavazza A, Buonavoglia C. Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. *Virology.* 2006; 346(2):301-11.

Martella V, Ciarlet M, Banyai K, Lorusso E, Arista S, Lavazza A, Pezzotti G, Decaro N, Cavalli A, Lucente MS, Corrente M, Elia G, Camero M, Tempesta M, Buonavoglia C. Identification of group A porcine rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) Genotype in Italian swine herds. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(2):577-80.

Mascarenhas JD, Paiva FL, Barardi CR, Gabbay YB, Simoes CO, Linhares AC. Rotavirus G and P types in children from Belem, northern Brazil, as determined by RT-PCR: occurrence of mixed P type infections. *J Diarrhoeal Dis Res.* 1998; 16(1):8-14.

Mascarenhas JD, Gusmao RH, Barardi CR, Paiva FL, Simoes CO, Gabbay YB, Monteiro TA, Linhares AC. Characterization of rotavirus P genotypes circulating among paediatric inpatients in northern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1999; 41(3):165-70.

Mascarenhas JD, Leite JP, Gabbay YB, Freitas RB, Oliveira CS, Monteiro TA, Linhares AC. Rotavirus G serotypes and p[G] genotypes identified in cases of reinfection among children participating in a trial with rhesus-human reassortant tetravalent vaccine (RRV-TV) in Belem, Brazil. *J Trop Pediatr.* 2002; 48(2):93-7.

Mascarenhas JD, Linhares AC, Gabbay YB, Leite JP. Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belem, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97(1):113-7.

Matthijnssens J, Rahman M, Martella V, Xuelei Y, De Vos S, De Leener K, Ciarlet M, Buonavoglia C, Van Ranst M. Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. *J Virol.* 2006; 80(8):3801-10.

Mattion NM, Mitchell DB, Both GW, Estes MK. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology.* 1991; 181(1):295-304.

Maunula L, von Bonsdorff CH. Short sequences define genetic lineages: phylogenetic analysis of group A rotaviruses based on partial sequences of genome segments 4 and 9. *J Gen Virol.* 1998; 79 (Pt 2):321-32.

Mendez E, Arias CF, Lopez S. Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *J Virol.* 1996; 70(2):1218-22

Mendez E, Lopez S, Cuadras MA, Romero P, Arias CF. Entry of rotaviruses is a multistep process. *Virology.* 1999; 263(2):450-9.

Meneghetti AC, Bolognini AM, Lauretti F, Linhares REC, Santos N, Nozawa CM. Incidence of Group A Rotavirus in Urban and Rural Áreas of the City of Londrina-Brazil, from 1995 to 1997. *Braz Arch Biol Technol.* 2001; 44(3): 257-261.

Montenegro FM, Correia JB, Rodrigues Falbo A, Dove W, Nakagomi T, Nakagomi O, Cuevas LE, Cunliffe NA, Hart CA. Anticipating rotavirus vaccines in Brazil: detection and molecular characterization of emerging rotavirus serotypes G8 and G9 among children with diarrhoea in Recife, Brazil. *J Med Virol.* 2007; 79(3):335-40.

Montero H, Arias CF, Lopez S. Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J Virol.* 2006; 80(18):9031-8.

Mota-Hernandez F, Calva JJ, Gutierrez-Camacho C, Villa-Contreras S, Arias CF, Padilla-Noriega L, Guiscafere-Gallardo H, de Lourdes Guerrero M, Lopez S, Munoz O, Contreras JF, Cedillo R, Herrera I, Puerto FI. Rotavirus diarrhea severity is related to the VP4 type in Mexican children. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(7):3158-62.

Nakagomi O, Nakagomi T, Arisawa K. A lack of significant association between the electropherotype or G-serotype of the infecting strain and disease severity of rotavirus gastroenteritis. *Arch Virol.* 2006; 151(10):1947-60.

Nakata S, Petrie BL, Calomeni EP, Estes MK. Electron microscopy procedure influences detection of rotaviruses. *J Clin Microbiol.* 1987; 25(10):1902-6.

Nilsson M, Svenungsson B, Hedlund KO, Uhnoo I, Lagergren A, Akre T, Svensson. Incidence and genetic diversity of group C rotavirus among adults. *J Infect Dis.* 2000; 182(3):678-84.

Orlandi PP, Magalhaes GF, Matos NB, Silva T, Penatti M, Nogueira PA, Silva LH. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). *Braz J Med Biol Res.* 2006; 39(4):507-17.

Page NA, Steele AD. Antigenic and genetic characterization of serotype G2 human rotavirus strains from South Africa from 1984 to 1998. *J Med Virol.* 2004; 72(2):320-7.

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

Parashar UD & Glass RI. Viral causes of gastroenteritis. In: *Viral Gastroenteritis.* Elsevier, 2003. cap. 1,1 : 9-21.

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

Parra GI, Espínola EE, Amarilla AA, Stupka J, Martinez M, Zunini M, Galeano ME, Gomes K, Russomando G, Arbiza J. Diversity of group A rotavirus strains circulating in Paraguay from 2002 to 2005: Detection of an atypical G1 in South America. *J Clin Virol.* 2007; 24.

Patton JT. Rotavirus VP1 alone specifically binds to the 3' end of viral mRNA, but the interaction is not sufficient to initiate minus-strand synthesis. *J Virol.* 1996; 70:7940–7947.

Patton JT, Vasquez-Del Carpio R, Spencer E. Replication and transcription of the rotavirus genome. *Curr Pharm Des.* 2004;10(30):3769-77.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP, Andrade ZP, De Castro L. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J Virol Methods.* 1985; 10(1):21-8.

Pereira HG, Linhares AC, Candeias JA, Glass RI. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. *Bull Pan Am Health Organ.* 1993; 27(3):224-33.

Pesavento JB, Lawton JA, Estes ME, Venkataram Prasad BV. The reversible condensation and expansion of the rotavirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(4):1381-6.

Petrie BL, Graham DY, Hanssen H, Estes MK. Localization of rotavirus antigens in infected cells by ultrastructural immunocytochemistry. *J Gen Virol.* 1982; 63(2):457-67.

Petrie BL, Greenberg HB, Graham DY, Estes MK. Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus Res.* 1984;1(2):133-52.

Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Evidence of intragenic recombination in g1 rotavirus VP7 genes. *J Virol.* 2007; 81(18):10188-94.

Pietruchinski E, Benati F, Lauretti F, Kisielius J, Ueda M, Volotao EM, Soares CC, Hoshino Y, Linhares RE, Nozawa C, Santos N. Rotavirus diarrhea in children and adults in a southern city of Brazil in 2003: distribution of G/P types and finding of a rare G12 strain. *J Med Virol.* 2006; 78(9):1241-9.

Pizarro JL, Sandino AM, Pizarro JM, Fernandez J, Spencer E. Characterization of rotavirus guanylyltransferase activity associated with polypeptide VP3. *J Gen Virol.* 1991; 72 (Pt 2):325-32.

Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* 1989; 8(12):3867-74.

Polanco-Marin G, Gonzalez-Losa Mdel R, Rodriguez-Angulo E, Manzano-Cabrera L, Camara-Mejia J, Puerto-Solis M. Clinical manifestations of the rotavirus infection and

his relation with the electropherotypes and serotypes detected during 1998 and 1999 in Merida, Yucatan, Mexico. *J Clin Virol.* 2003; 27(3):242-6.

Pongsuwanna Y, Guntapong R, Chiwakul M, Tacharoenmuang R, Onvimala N, Wakuda M, Kobayashi N, Taniguchi K. Detection of a human rotavirus with G12 and P[9] specificity in Thailand. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(4):1390-4.

Prasad BV, Rothnagel R, Zeng CQ, Jakana J, Lawton JA, Chiu W, Estes MK. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature.* 1996; 382(6590):471-3.

Rahman M, Banik S, Faruque AS, Taniguchi K, Sack DA, Van Ranst M, Azim T. Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(9):4460-5.

Rahman M, Sultana R, Ahmed G, Nahar S, Hassan ZM, Saiada F, Podder G, Faruque AS, Siddique AK, Sack DA, Matthijnsens J, Van Ranst M, Azim T. Prevalence of G2P[4] and G12P[6] rotavirus, Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(1):18-24. (a)

Rahman M, Matthijnsens J, Yang X, Delbeke T, Arijs I, Taniguchi K, Iturriza-Gómara M, Iftekharuddin N, Azim T, Van Ranst M. Evolutionary history and global spread of the emerging g12 human rotaviruses. *J Virol.* 2007; 81(5):2382-90. (b)

Rodger SM, Bishop RF, Holmes IH. Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant., *J Clin Microbiol.* 1982; 16(4):724-6.

Rosa e Silva ML, Naveca FG, Pires de Carvalho I. Epidemiological aspects of rotavirus infections in Minas Gerais, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2001; 5(4):215-22.

Rosa e Silva ML, Pires De Carvalho I, Gouvea V. 1998-1999 rotavirus seasons in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil: detection of an unusual G3P[4] epidemic strain. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(8):2837-42.

Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, Chevart B, Espinoza F, Gillard P, Innis BL, Cervantes Y, Linhares AC, Lopez P, Macias-Parra M, Ortega-Barria E, Richardson V, Rivera-Medina DM, Rivera L, Salinas B, Pavia-Ruz N, Salmeron J, Ruttimann R, Tinoco JC, Rubio P, Nunez E, Guerrero ML, Yarzabal JP, Damaso S, Tornieporth N, Saez-Llorens X, Vergara RF, Vesikari T, Bouckennooghe A, Clemens R, De Vos B, O'Ryan M; Human Rotavirus

Vaccine Study Group. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2006; 354(1):11-22.

Sadovsky AD. Agentes infecciosos associados à diarreia aguda em crianças até três anos de idade: estudo em um hospital de referência no município de Vitória – ES. 2005. 131f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J Clin Microbiol.* 1980; 12(1):105-11.

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

Samajdar S, Varghese V, Barman P, Ghosh S, Mitra U, Dutta P, Bhattacharya SK, Narasimham MV, Panda P, Krishnan T, Kobayashi N, Naik TN. Changing pattern of human group A rotaviruses: emergence of G12 as an important pathogen among children in eastern India. *J Clin Virol.* 2006; 36(3):183-8.

Sandino AM, Jashes M, Faundez G, Spencer E. Role of the inner protein capsid on in vitro human rotavirus transcription. *J Virol.* 1986; 60(2):797-802.

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

Santos N, Lima RC, Pereira CF, Gouvea V. Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(9):2727-9.

Santos N, Lima RC, Nozawa CM, Linhares RE, Gouvea V. Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(8):2734-6.

Santos N, Volotao EM, Soares CC, Albuquerque MC, da Silva FM, de Carvalho TR, Pereira CF, Chizhikov V, Hoshino Y. Rotavirus strains bearing genotype G9 or P[9]

recovered from Brazilian children with diarrhea from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(3):1157-60.

Santos N, Soares CC, Volotao EM, Albuquerque MC, Hoshino Y. Surveillance of rotavirus strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(7):3399-402.

Santos N, Volotao EM, Soares CC, Campos GS, Sardi SI, Hoshino Y. Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(8):4064-9.

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

Schuck P, Taraporewala Z, McPhie P, Patton JT. Rotavirus nonstructural protein NSP2 self-assembles into octamers that undergo ligand-induced conformational changes. *J Biol Chem.* 2001; 276(13):9679-87.

Serravalle K, Santos N, Sardi SI, Silva SP, Ribeiro Junior Hda C, Mattos AP, Campos GS. Molecular characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Salvador, Bahia, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2007; 11(1):35-9.

Shaw RD, Fong KJ, Losonsky GA, Levine MM, Maldonado Y, Yolken R, Flores J, Kapikian AZ, Vo PT, Greenberg HB. Epitope-specific immune responses to rotavirus vaccination. *Gastroenterology.* 1987; 93(5):941-50.

Shinozaki K, Okada M, Nagashima S, Kaiho I, Taniguchi K. Characterization of human rotavirus strains with G12 and P[9] detected in Japan. *J Med Virol.* 2004; 73(4):612-6.

Souza MB, Racz ML, Leite JP, Soares CM, Martins RM, Munford V, Cardoso DD. Molecular and serological characterization of group a rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Goiania, Brazil, 1998-2000. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003; 22(7):441-3.

Steyer A, Poljsak-Prijatelj M, Bufon T, Sedmak M, Vidmar L, Mijovski JZ, Marin J. First detection of group C rotavirus in patients with gastroenteritis in Slovenia. *J Med Virol.* 2006; 78(9):1250-5.

Steyer A, Poljsak-Prijatelj M, Bufon TL, Marcun-Varda N, Marin J. Rotavirus genotypes in Slovenia: unexpected detection of G8P[8] and G12P[8] genotypes. *J Med Virol.* 2007; 79(5):626-32.

Suzuki H, Chen GM, Hung T, Beards GM, Brown DW, Flewett TH. Effects of two negative staining methods on the Chinese atypical rotavirus. *Arch Virol.* 1987;94(3-4):305-8.

Svensson L, Sheshberadaran H, Vene S, Norrby E, Grandien M, Wadell G. Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. *J Gen Virol.* 1987; 68 (Pt 3):643-51.

Swierkosz EM. Nosocomial Viral Infections Revisited. *Clin Microbiol News.* 2001; 23(6):43-48.

Taniguchi K, Urasawa T, Morita Y, *et al.* Direct serotyping of human rotavirus in stools by an enzyme-linked immunosorbent assay using serotype 1-, 2-, 3-, and 4-specific monoclonal antibodies to VP7. *J Infect Dis.* 1987;155:1159–1166.

Taniguchi K, Urasawa T, Kobayashi N, Gorziglia M, Urasawa S. Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I specificity and long RNA pattern: implication for new G serotype specificity. *J Virol.* 1990; 64(11):5640-4.

Taylor JA, Bellamy AR. Interaction of the rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 with viral and cellular components. In: *Viral Gastroenteritis.* Elsevier, 2003. cap. II,7, p. 225-235.

Teixeira JM, Camara GN, Pimentel PF, Ferreira MN, Ferreira MS, Alfieri AA, Gentsch JR, Leite JP. Human group C rotavirus in children with diarrhea in the Federal District, Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31(11):1397-403.

Tian Y, Tarlow O, Ballard A, Desselberger U, McCrae MA. Genomic concatemerization/deletion in rotaviruses: a new mechanism for generating rapid genetic change of potential epidemiological importance. *J Virol.* 1993; 67(11):6625-32.

Tian P, Hu Y, Schilling WP, Lindsay DA, Eiden J, Estes MK. The nonstructural glycoprotein of rotavirus affects intracellular calcium levels. *J Virol.* 1994; 68(1):251-7.

Tian P, Estes MK, Hu Y, Ball JM, Zeng CQ, Schilling WP. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 1995; 69(9):5763-72.

Timenetsky Mdo C, Santos N, Gouvea V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(10):2622-4.

Torres-Vega MA, González RA, Duarte M, Poncet D, López S, Arias CF. The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J Gen Virol.* 2000; 81(Pt 3):821-30.

Trabelsi A, Peenze I, Pager C, Jeddi M, Steele D. Distribution of rotavirus VP7 serotypes and VP4 genotypes circulating in Sousse, Tunisia, from 1995 to 1999: emergence of natural human reassortants. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(9):3415-9.

Unicomb LE, Podder G, Gentsch JR, Woods PA, Hasan KZ, Faruque AS, Albert MJ, Glass RI. Evidence of high-frequency genomic reassortment of group A rotavirus strains in Bangladesh: emergence of type G9 in 1995. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(6):1885-91.

Valenzuela S, Pizarro J, Sandino AM, Vásquez M, Fernández J, Hernández O, Patton J, Spencer E. Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *J Virol.* 1991; 65(7):3964-7.

Varghese V, Das S, Singh NB, Kojima K, Bhattacharya SK, Krishnan T, Kobayashi N, Naik TN. Molecular characterization of a human rotavirus reveals porcine characteristics in most of the genes including VP6 and NSP4. *Arch Virol.* 2004; 149(1):155-72.

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

Vesikari T, Isolauri E, D'Hondt E, Delem A, Andre FE, Zissis G. Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *Lancet.* 1984; 1(8384):977-81.

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

Vicentini F, Cuquetto SC, Nunes JM, Rocha GC, Teixeira LS, Santos DB, Fragoso RP, Kitoko PM. Community diarrhoea by group A rotavirus, in Vitória, Espírito Santo State in the 2003. *Virus Reviews & Research*. 2004; 9(1): 218.

Volotao EM, Soares CC, Maranhao AG, Rocha LN, Hoshino Y, Santos N. Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro-Brazil during 2000-2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities. *J Med Virol*. 2006; 78(2):263-72.

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

Zao CL, Yu WN, Kao CL, Taniguchi K, Lee CY, Lee CN. Sequence analysis of VP1 and VP7 genes suggests occurrence of a reassortant of G2 rotavirus responsible for an epidemic of gastroenteritis. *J Gen Virol*. 1999; 80 (Pt 6):1407-15.

Zhang M, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *J Virol*. 2000; 74(24):11663-70.

Zhang LJ, Fang ZY, Zeng G, Steele D, Jiang BM, Kilgore P. Relationship between severity of rotavirus diarrhea and serotype G and genotype. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2007; 21(2):144-6.

Zeng CQY, Wentz MJ, Cohen J, *et al*. Characterization and replicase activity of double-layered and single-layered rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants. *J Virol* 1996; 70:2736–2742.

de Zoysa I & Feachem RG. Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: rotavirus and cholera immunization. *Bull World Health Organ*. 1985; 63(3):569-83.

Ward RL, Bernstein DI, Young EC, Sherwood JR, Knowlton DR, Schiff GM. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *J Infect Dis*. 1986; 154(5):871-80.

Ward RL. Mechanisms of protection against rotavirus in humans and mice. *J Infect Dis*. 1996; 174 Suppl 1:S51-8.

WHO. Report of the meeting on future directions for rotavirus vaccine research in developing countries. 2000; Geneva, Feb 9–11.

Yolken RH, Peterson JA, Vonderfecht SL, Fouts ET, Midthun K, Newburg DS. Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. *J Clin Invest*. 1992; 90(5):1984-91.

9 ANEXOS

Anexo 1: Quadro A1: Estudos de genotipagem de RVs realizados no Brasil.

Região	Estado	Período de coleta	Origem das amostras	Número de amostras genotipadas	Genótipos comuns	Genótipos incomuns ³	Infecção mista	Referência
-	BR: 9 estados + DF	-	-	130 ¹	G1P[8] – 43% G2P[4] – 12% G3P[8] – 6% G4P[8] – 6%	G5, P[6] e P[9] - 12%	21%	Leite <i>et al</i> , 1996
Sudeste	RJ	Mar/1996 – Dez/1997	Laboratórios	49	G1 – 27% G3 – 12%	G5 – 25% G8 – 4% G10 – 16%	16%	Santos <i>et al</i> , 1998
	RJ	Mar/1997 – Dez/1999	Hospital	157	G9 – 15,9%	P[9] – 10,2%		Santos <i>et al</i> , 2001 ²
	RJ	Jan/1997 – Dez/1998	Hospital	53	G2P[4] – 21% G9P[8] – 9%	G2P[8] – 17% G10P[8] – 6% G4P[6] – 4% G9P[6] – 2% G9P[4] – 2%	2%	Araújo <i>et al</i> , 2001 ²
	RJ	Maio/1996 – Dez/1998	Hospital	91	G2P[4] – 21% G1P[8] – 17%	G2P[8] – 13% G5P[8] – 11%	2%	Araújo <i>et al</i> , 2002

					G3P[8] – 13% G9P[8] – 7%	G10P[8] – 4% G4P[6] – 3% G3P[6] – 1 % G9P[4] – 1% G9P[6] – 1%		
RJ	Mar/1997 – Dez/1999	-	101/157	G1P[8] – 39,6% G2P[4] – 20,8% G3P[8] – 9,9% G4P[8] – 3% G9P[8] – 14,8%	G1P[9] – 1% G2P[8] – 1% G3P[9] – 5,9% G9P[4] – 1% G9P[6] – 3%	16%	Santos <i>et al</i> , 2003	
RJ	Fev/2004- Set/2004	Hospital	64	G1P[8] – 58% G9P[8] – 40%	-	1,5%	Carvalho-Costa <i>et al</i> , 2006	
RJ	Jan/2000 – Jul/2004	Hospital e ambulatório	129	G1P[8] – 46,5% G9P[8] – 28,6% G4P[8] – 15,5%	G8P[4] – 0,8% G10P[9] – 0,8% G4P[9] – 0,8% G1P[6] – 0,8% G9P[4] – 0,8%	1,6%	Volotão <i>et al</i> , 2006	
RJ/ES ⁴	Ago/2002- Dez/2002	-	RJ – 20 ES - 52	RJ: G1P[8] – 40% G2P[4] – 25% G9P[8] – 20%	G5P[8] – 2% (no ES)	-	Araújo <i>et al</i> , 2003	

					ES: G1P[8] – 62% G9P[8] – 13% G2P[4] – 2%			
	MG	Jan/1998 – Dez/1999	Hospital e ambulatório	94	G3P[4] – 19% G1P[8] – 1%	G4P[6] – 1% G8 – 2% G1P[4] – 1%	27%	Rosa e Silva <i>et al</i> , 2002
	SP	1986 – 1992	Hospital, creches e ambulatórios	139	G3 – 22% G1 – 17%	-	28%	Timenetsky <i>et al</i> , 1994
	SP	Ago/1994 – Jul/1995	Hospital e ambulatorial	35	G1P[8] – 31,4% G2P[4] – 8,6% G3P[8] – 2,8%	G5P[8] – 22,8% G1P[4] – 8,6% G3P[4] – 5,7% G2P[6] – 2,8%	2,8%	Carmona <i>et al</i> , 2004
	SP	1996/2003	Hospital	431	G1P[8] – 66,6% G9P[8] – 16,9% G4P[8] – 7,2% G2P[4] – 1% G3P[8] – 0,6%	G1P[4] – 1,8% G1P[6] – 0,3% G2P[6] – 0,6% G9P[6] – 0,3% G9P[4] – 1,2%	2,4%	Carmona <i>et al</i> , 2006
Centro-Oeste	GO	1987-1994		90 ⁵	G2--28.0% G1--19.7%	G5 – 2,3%		Cardoso <i>et al</i> , 2000
	GO	Mar/1986 – Jun/1995	Hospital, creches e ambulatórios	74 ⁶	G1 – 21,6%	-	-	Cardoso <i>et al</i> . 2001

	GO	Mar/1998 – Mar/2000	Hospital	120	G1P[8] – 20,8%	G1P[6] -10,8% G2P[8] – 1,7% G2P[6] – 0,8% G9P[6] – 4,2%	-	Souza <i>et al</i> , 2003
	GO	Jul/2000 – Out/2002	Hospital	77	G1P[8] – 77,8% G9P[8] – 11,1% G4P[8] – 5,6%	G1P[6] - 5,6%	21%	Costa <i>et al</i> , 2004
Sul	PR	Maio/1995 – Março/1997	-	38	G1 – 94%	-	6%	Meneghetti <i>et al</i> , 2001
	PR	Maio/2003 – Ago/2003	Hospital e ambulatorial	61	G1P[8] – 86,9% G9P[8] – 3,3%	G12P[9] – 1,6%	-	Pietruchinski <i>et al</i> , 2006
Nordeste	BA	1999, 2000 2002	Hospital	208	G9P[8] – 74,5% G1P[8] – 5,8% G4P[8] – 1,4%	-	2%	Santos <i>et al</i> , 2005
	MA	Jun/1997 – Jun/1999	Hospital	42 ⁵	G1 – 66,7% G2 – 14,3%	-	G1/G3 – 2,4%	Luz <i>et al</i> , 2005
	BA	1999, 2000 2002	Hospital	163	G9 – 85,2% G1 – 7,1% G4 – 1,2% P[8] – 85,1% P[4] – 0,6%	-	-	Serravalle <i>et al</i> , 2007
	PE	Maio/2004 - Abril/2005	Serviço de emergência	102	G1P[8] – 48% G9P[8] – 29% G2P[4] – 3%	G8P[6] - 2%	6%	Montenegro <i>et al</i> , 2007
Norte	PA	-	Hospital	23 ⁵	G2 - 77,8%	-	-	Gusmão <i>et al</i> .

								1995
PA	Dez/1982 - Mar/1986	-	17	G1P[8] – 29%	G1P[4] – 18%	23%		Mascarenhas <i>et al</i> , 1998
PA	Nov/1992 – Nov/1994	Hospital	55 ⁵	G2 – 83,6% G1 – 14,5%	-	1,8%		Gusmão <i>et al</i> , 1999
PA	Nov/1992 – Ago/1993	Hospital	24	G2P[4] – 50%	G2P[8] – 28,6%	3,6%		Mascarenhas <i>et al</i> , 1999
PA	-	“Ensaio clínico”	83	G1P[8] – 53% G2P[4] – 26,6%	G1P[6] - 4,8% G4P[6] - 4,8% G1P[4] – 2,4% G2P[8] – 1,2% G5 – 4,4%	2,4%		Mascarenhas <i>et al</i> , 2002a
PA	-	“Ensaio clínico”	11	G1P[8] – 45% G2P[4] – 36%	G5P[6] – 9% G1P[4] – 9%	-		Mascarenhas <i>et al</i> , 2002b
PA	Maio/1996 – Maio/1998	Hospital ⁷	18	-	G2 – 94% P[6] – 93%	-		Linhares <i>et al</i> , 2002

¹Cepas adaptadas em cultura provenientes de 9 estados brasileiros e do Distrito Federal.

² Primeiro relato de G9 no Brasil

³ Genótipos G ou P incomuns ou combinações incomuns

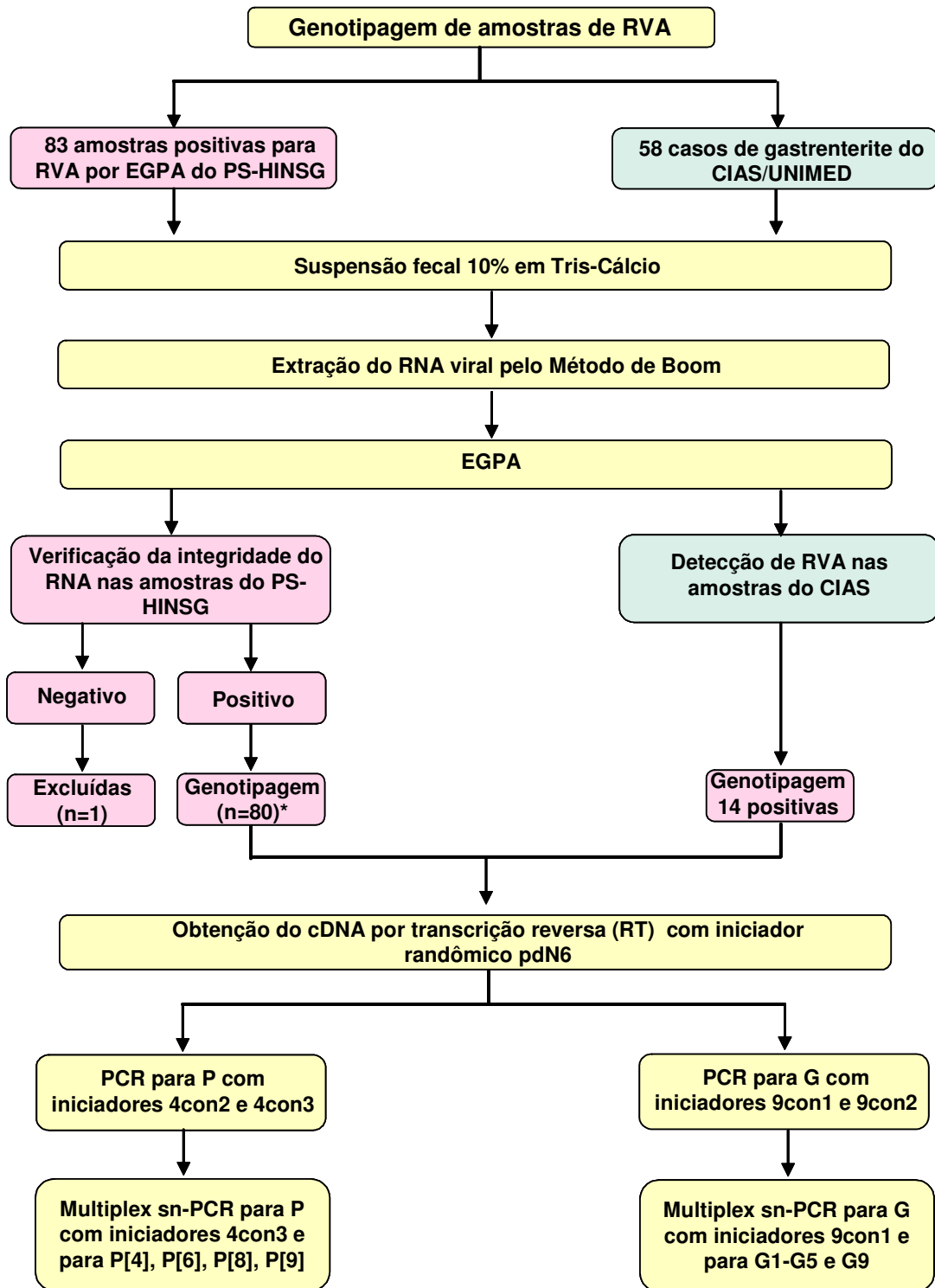
⁴ Trabalho apresentado em Encontro Científico

⁵ Sorotipagem com anticorpos monoclonais

⁶ Genotipagem por hibridização

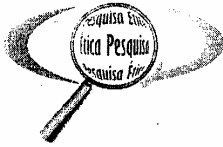
⁷ Enfermaria neonatal

Anexo 2: Fluxograma de processamento das amostras.



*2 amostras foram excluídas por falta de material fecal

Anexo 3: Carta de aprovação do Comitê de Ética.



Comitê de Ética em Pesquisa - CIAS
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE
Unimed Vitória

Vitória, 09 de Dezembro de 2004

Ilmo(a) Sr(a) **Liliana Cruz Spano**

Nesta

Prezado(a) Senhor(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Rotavírus na Grande Vitória – ES: Estudo de Prevalência e Análise Molecular de Cepas Associadas à Diarréia Aguda e Ambientais**" assim como as respostas fornecidas às pendências formuladas na reunião de **14 de Outubro de 2004**, foram analisados por esse comitê, tendo sido, o citado projeto considerado:

APROVADO

de acordo com a resolução 196 de 1996 e suas complementares.

Foram aprovados:

1. **Projeto – (sem ref versão)**
2. **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (sem ref versão)**

Atenciosamente,


Dr. Sergio Ragi Eis
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do CIAS
CRM-ES 4608

Av. Leitão da Silva, 2311, Itararé – Vitória (ES) – cep: 29047-575
Tel: +27 3335-5000 Fax: +27 3335-5000 e-mail: cep@unimedvx.com.br

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](#)