



PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

INSTITUTO DE CIÊNCIA E SAÚDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

ISABELA BRANDÃO PEIXOTO

**ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO
ROTAVÍRUS**

HUMANO NA CIDADE DE SALVADOR (BA).

Salvador

2013

ISABELA BRANDÃO PEIXOTO

**ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO
ROTAVÍRUS
HUMANO NA CIDADE DE SALVADOR (BA).**

Dissertação apresentada ao programa de Pesquisa e Pós- Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciência e Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Inês Sardi

Co-orientador: Prof. Dr. Gubio Soraes Campos

Salvador

2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,
SIBI - UFBA.

P379 Peixoto, Isabela Brandão
Estudo e caracterização molecular do Rotavírus Humano na
cidade de Salvador (BA) / Isabela Brandão Peixoto. – Salvador,
2013.
74 f.
Orientadora: Prof^a. Dr^a Silvia Inês Sardi
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciência e Saúde, 2013.
1. Biologia Molecular. 2. Rotavírus. 3. Rotavírus. 4.
Imunologia. I. Sardi, Silvia Inês. II. Universidade Federal da
Bahia. III. Título.
CDU 576.32

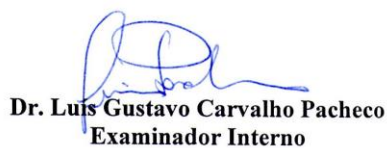


ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA PARA JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA PÓS-GRADUANDA ISABELA BRANDÃO PEIXOTO

Ao vigésimo oitavo dia do mês de fevereiro do ano de dois mil e treze, às nove horas, no auditório Ophélia Gaudenzi, no terceiro andar do Instituto de Ciências da Saúde, em sessão pública, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dra. Silvia Ines Sardi, orientadora, Dr. Luís Gustavo Carvalho Pacheco e Dr. Eduardo Hage Carmo, com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de dissertação intitulado: “Estudo e caracterização molecular do rotavírus humano na cidade de Salvador (BA)”, da pós-graduanda **ISABELA BRANDÃO PEIXOTO**. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora concluiu que a pós-graduanda teve a sua Defesa de Dissertação de Mestrado **APROVADA**, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, encerrou-se a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca Examinadora e pela mestranda. Salvador, 28 de fevereiro de 2013.



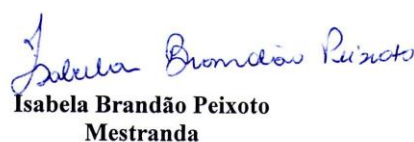
Dra. Silvia Ines Sardi
Orientadora



Dr. Luís Gustavo Carvalho Pacheco
Examinador Interno



Dr. Eduardo Hage Carmo
Examinador Externo



Isabela Brandão Peixoto
Mestranda

Dedico esse trabalho a

Antonio Reis e Maiza, pais maravilhosos, pelo amor e apoio incondicional.

E a Antoniel e Maria da paz, meus exemplos e meus avós, por me ajudarem a realizar mais um sonhos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ser minha força e minha fortaleza.

A meus pais **Antonio Reis e Maiza**, e a meu irmão **Danilo**, pelo amor e apoio incondicional.

Aos meus avós **Antoniél e Maria da Paz**, por serem meus grandes incentivadores.

A **Dra. Sivia e Dr. Gubio**, pela orientação, aprendizado e conselhos.

Ao laboratório de virologia, em especial **Delane, Camila e Fabiana** pela parceria e pela amizade construída.

As minhas amigas e colegas de mestrado **Aryane e Priscilla**, por dividirmos todos os sorrisos e choros dessa caminhada.

A **Victor Hugo** pela compreensão, companheirismo e amor.

Aos meus amigos, em pelo incentivo e carinho.

Ao **mestrado de Biotecnologia** da Universidade Federal da Bahia, pela oportunidade.

A **FAPESB** pelo apoio financeiro.

A todos aquele que mesmo não sendo aqui mencionados colaboram para a concretização dessa conquista.

“O coração do homem planeja o seu caminho, mas
o Senhor lhe dirige os passos.”

(Provérbios 16:9)

PEIXOTO,Isabela Brandão. *Pasta do professor*: o uso de cópias nas universidades de Salvador. 74f. il. 2013. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciência e Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

RESUMO

Rotavírus é um dos principais responsáveis por quadros de gastroenterite em crianças. Neste estudo foi analisado o perfil molecular do Rotavírus identificado em quadros de gastroenterite em crianças, e o perfil de resposta imune contra esse vírus. 90 amostras de fezes foram coletadas de crianças hospitalizadas com sintomas de gastroenterite de abril a julho de 2010 no município de Salvador, e foram submetidas à detecção do Rotavírus através das técnicas ELISA. Do total de amostras analisadas, 89% (80/90) foram positivas e 11%(10/90) foram negativas no ELISA. Foi observado maior detecção de gastroenterite por Rotavírus em crianças menores de dois anos de idade, sendo encontrada no mês de junho maior frequência da infecção por esse vírus. Contudo, em 53 amostras positivas no ELISA foi realizada a extração do RNA viral diretamente das fezes, e posteriormente submetido à identificação do eletroferotipo por SDS-PAGE e genotipagem através RT-PCR. Foi observado o eletroferotipo correspondente ao Rotavírus do grupo A em todas as amostras analisadas por SDS-PAGE. Em relação à determinação dos genótipos de Rotavírus, foi possível a identificação de 4 genótipos G (G1,G2,G3 e G9) com predominância de G1 e G2, dois genótipos P (P4 e P6), e a combinação dos genótipos G e P identificaram cinco cepas circulantes (G1P[4],G1P[6],G2P[4],G2P[6] e G3[P4]). A detecção da resposta imune contra o Rotavírus foi realizada em 50 soros de crianças com 12 anos através da técnica de Western Blot, e 42% das amostras (21/50) identificaram bandas correspondente às proteínas imunogênicas virais. Concluindo, nesse trabalho observou-se a contínua circulação do RV do grupo A, com mudança do perfil de circulação dos genótipos RV para a atual predominância de G1, G2, P4 e P6, e uma população de crianças susceptível com capacidade de resposta imune para RV.

Palavras-chaves: Rotavírus, crianças, genótipos, resposta imune.

PEIXOTO, Isabela Brandão. *Teachers. files: the practice of photocopying at the universities in Salvador (Bahia, Brazil)*. 74 pp. ill. 2013. Master Dissertation . Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

ABSTRACT

Rotavirus is commonly associated with gastroenteritis in children. In this study, we investigated the molecular profile of rotavirus identified in children with symptoms of gastroenteritis, and the profile of immune response against this virus. 90 fecal samples were obtained from patients hospitalized with symptoms of acute gastroenteritis from April to July 2010 in Salvador, and were subjected to rotavirus detection by ELISA. The samples analyzed by ELISA, 89% (80/97) were positive and 11% (10/90) were negative. It was found an increase detection of Rotavirus gastroenteritis in children under two years of age, was found in June increased frequency of infection with this virus. However, 53 samples positive in ELISA the viral RNA was extracted directly from faeces sample and later submitted to identification of electropherotype by SDS-PAGE and genotyping by RT-PCR. It was observed the electropherotype corresponding to rotavirus of group A in all samples analyzed by SDS-PAGE. In relation to the Rotavirus's genotypes was identified four genotypes G (G1, G2, G3 and G9) with predominance of G1 e G2, two genotypes P (P4 and P6), and the combination of G genotypes identified five strains circulating (G1P [4], G1P [6], G2P [4], G2P [6] and G3 [P4]). The detection immune response against the Rotavirus was carried out in 50 sera from children under 11 years old by Western blot, and in 42% of this samples (21/50) were identified bands correspondent to the immunogenic viral proteins. In conclusion, this study observed the continuous circulation of the RV group A, with changing of Rotavirus genotypes circulating profile for the present predominance of G1, G2, P4 and P6, and a children's susceptible population with capacity to develop an immune response against RV.

Key Words: Rotavírus, children, genotypes, immune response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Microscopia eletrônica do RV.....	19
Figura 2 Eletroforese em gel de poliacrilamida dos segmentos genômicos de RV e as Proteínas virais.....	20
Figura 3: Organização do genoma de RV.....	21
Figura 4: Figura 4: Ilustração esquemática do padrão de migração dos segmentos genômicos do RV.....	22
Figura 5: Modelo para penetração do RV em células susceptíveis por meio de endocitose.....	28
Figura 6: Ciclo replicativo do RV.....	28
Figura 7: Estimativa global das mortes por gastroenterite associada ao RV.....	32
Figura 8: Distribuição dos genótipos de RV nas regiões do Brasil.....	33
Quadro 1: Sequências de iniciadores utilizados no RT-PCR.....	41
Quadro 2: Sequências de iniciadores para identificação de G (VP7) utilizados no PCR.....	42
Quadro 3: Sequências de iniciadores para identificação de P (VP4) utilizados no PCR.....	42
Figura 9: Detecção do RV através da técnica ELISA.....	48
Figura 10: Distribuição de gastroenterite por RV durante o período analisado.....	49
Figura 11: Distribuição de gastroenterite por Rotavírus em relação às diferentes faixas etárias.....	49
Figura 12: SDS-PAGE: Eletroforese do RNA genômico do Rotavírus em gel de poliacrilamida 7,5%.....	50
Figura 13: PCR: Genótipos G.....	52
Figura 14: PCR: Genótipos P.....	53
Figura 15: Imunofluorescência Indireta.....	55
Figura 16: Identificação das proteínas do RV bovino por soros de crianças.....	57

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Detecção do RV por ELISA e SDS-PAGE em amostras fecais de crianças.....	51
Tabela 2: Distribuição das frequências dos genótipos G detectados em amostras fecais de crianças.....	52
Tabela 3: - Distribuição das frequências dos genótipos P detectados em amostras fecais de crianças.....	53
Tabela 4: Distribuição das frequências das combinações binárias dos genótipos G e P.....	54
Tabela 5: Distribuição das faixa etárias dos soros positivos no Western- blot.....	56

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agencia de Vigilância Sanitária
AS	Ácido Siálico
ATP.	Adenina Trifosfato
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
DLP	Partícula Viral Formada Por Duas Camadas
D-MEM	Modificação do Meio Essencial Eagle
EDIM	Vírus Da Diarreia Epidêmica De Camundongos
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Ou <i>Enzyme-Liked Imussorbent Assay</i>
FITCH	Isotiocionato de Fluoresceína
ICTV	Comitê Internacional de Taxinomia Vira
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G1
IR	Intermediários De Replicação
ME	Microscopia Eletrônica
NoV	Norovírus
NSP	Proteína Viral Não-Estrutural
ORF	Regiões Aberta De Leitura
PAGE	Eletroforese Em Gel De Poliacrilamida
PB	Pares de Bases
PBS	Tampão Salina Fosfato

PBS-T	Tampão Salina Fosfato acrescido de Tween
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
-RCWG	The Rotavirus Classification Working Group
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Reação de Transcriptase Reversa
RV	Rotavírus
SDS-PAGE	Dodecil-sulfato de sódio (SDS)- Gel de Poliacrilamida (PAGE)
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
VP	Proteína Viral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivo específico	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 ROTAVÍRUS.....	17
3.1.1 Histórico	17
3.1.2 Morfologia	18
3.1.3 Genoma	20
3.1.3.1 Perfil eletroforético.....	21
3.1.3.2 Rearranjo gênico e mutação	22
3.1.4 Classificação	23
3.1.5 Ciclo de replicação	25
3.2 PATOGÊNIA E SINAIS CLÍNICOS.....	29
3.3 EPIDEMIOLOGIA.....	30
3.4 RESPOSTA IMUNE.....	33
3.5 VACINA.....	35
3.6 DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS.....	37
3.6.1 Detecção das partículas virais	37
3.6.2 Detecção sorológica	38
3.6.3 Isolamento Viral	38
3.6.4 Detecção do antígeno viral	38
3.6.5 Diagnóstico Molecular	38
3.6.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	39
3.6.5.2 Reação de Transcriptase Reversa (RT) e Reação em Cadeia da polimerase (PCR).....	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 AMOSTRAGEM.....	40
4.2 TESTE IMUNOENZIMÁTICO- ELISA.....	40
4.3 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL.....	40

4.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	41
4.5 GENOTIPIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	41
4.5.1 Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	43
4.5.2 Nested- PCR.....	43
4.6 DETECÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CONTRA O RV.....	42
4.6.1 Produção do RV Bovino.....	42
4.6.2 Imunofluorescência Indireta.....	45
4.6.3 Detecção da Resposta Imune.....	45
4.6.3.1 Amostragem.....	46
4.6.3.2 Western Blot.....	46
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	47
5 RESULTADOS.....	48
5.1 PERFIL DA INFECÇÃO POR ROTAVÍRUS.....	48
5.2 IDENTIFICAÇÃO DO ELETROFENÓTIPO DE RV.....	49
5.3 GENOTIPIFICAÇÃO DOS RV ISOLADOS.....	51
5.3.1 Genotipagem G.....	51
5.3.2 Genotipagem P.....	53
5.3.3 Combinação dos genótipos P e G.....	54
5.4 DETECÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CONTRA RV.....	54
5.4.1 Produção Viral.....	54
5.4.2 Western Blot.....	56
6 DISCUSSÃO.....	58
7 CONCLUSÃO.....	63
8 PERSPECTIVAS.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Os quadros clínicos de diarreia aguda em crianças podem estar associados à agente etiológico de origem viral, bacteriano ou parasitário (GLASS *et al.*, 2006). Dentre os agentes virais, o Rotavírus (RV) é o mais comumente relacionado com quadros de gastroenterite em crianças, sendo o responsável por mais de 600.000 mortes por ano no mundo (PARASHAR *et al.*, 2003; SANTOS & HOSHINO, 2005).

O RV pertence à família *Reoviridae*, é um vírus não envelopado, com triplo capsídeo protéico de morfologia icosaédrica, e o seu genoma RNA é composto por 11 segmentos de dupla fita, que codificam seis proteínas não estruturais e seis proteínas estruturais. Dentre as proteínas estruturais, a VP4, VP6 e VP7 são as de maior imunogenicidade induzindo uma resposta imune protetora com a produção de anticorpos neutralizantes (LINHARES, 2000; PARASHAR, 2006). Estudos moleculares com essas proteínas resultaram na classificação do RV: a VP4 classificou em 27 genótipos “P”; a VP6 classificou em sete Grupos denominados de A a G; e a VP7 classificou esse vírus em 15 Genótipos “G”.

A infecção por RV possui período de incubação de 1 a 3 dias, acompanhadas de febre, diarreia e vômito. As partículas virais são eliminadas em grande quantidade nas fezes. A principal forma de transmissão é oral-fecal, pela ingestão de água, alimentos, fômites ou por contato pessoal (BRAGA, 2006; ARMAH *et al.*, 2010, CHANDRAN *et al.*, 2010).

No Brasil, o RV foi identificado pela primeira vez por Linhares e colaboradores em 1976, e dados epidemiológicos atuais sobre a infecção por RV apontam que esse vírus é o responsável por até 30% dos casos de diarreia agudas no país. (LINHARES, 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005, OLIVEIRA, R.B, 2011).

Na Bahia o RV pode ser responsável por até 20% dos casos notificados de gastroenterites (BOLETIM INFORMATIVO, 2007). O estudo realizado por Campos e colaboradores (2002), mostrou que o RV do grupo A é predominante em casos de

gastroenterite na cidade de Salvador. E Serravalle e colaboradores (2007) e Munford e colaboradores (2009) identificaram a presença dos genótipos G1, G2, G4 e G9 nessa população. Dessa forma, os estudos sobre a caracterização do Rotavírus circulante ajudaria a elucidar questões como diversidade genética, história evolutiva e circulação desse vírus na cidade de Salvador, contribuindo para novas políticas de vacinação.

2 OBJETIVOS:

2.1 Objetivo Geral:

Analisar o perfil molecular do Rotavírus Humano identificado em quadros de diarreia aguda de crianças, e detectar a resposta imune contra o RV.

2.2 Objetivos Específicos:

- Detectar o RV nas fezes pelo método de imunoenzimático ELISA.
- Identificar o eletroferotipo de RV detectado nas fezes pela técnica de Eletroforese em gel de Poliacrilamida.
- Comparar as técnicas ELISA e SDS-PAGE.
- Caracterizar o perfil molecular do RV através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase.
- Analisar e comparar o perfil molecular do RV descrito na cidade de Salvador.
- Caracterizar a resposta Imune para as proteínas do RV utilizando a técnica de Western Blot.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ROTAVÍRUS

3.1.1 Histórico

O RV é considerado um importante agente etiológico de gastroenterite não bacteriana em várias espécies de mamíferos e aves (PARASHAR *et al.*, 2003). A etiologia da doença diarreica associada ao RV foi descrita pela primeira vez em 1963 em camundongos jovens, e nesse período esse vírus recebeu o nome de Vírus da Diarreia Epidêmica de camundongos- EDIM-vírus. Posteriormente, a infecção por RV foi observados em outros animais como equinos, ovinos, felinos, suínos, bovinos, caninos, lapinos e aves (ESTES,2001).

Em 1973 foi descrito a associação desse vírus com diarreia em humanos, comprovado por Bishop e colaboradores, através de Microscopia eletrônica (ME) em amostras de fezes e biopsia duodenal de crianças hospitalizadas com diarreia não bacteriana. Após a sua identificação, o RV foi primeiramente chamado de Orbivírus, Duodenovírus e Reovírus-like, mas por apresentar a morfologia semelhante a uma roda em imagens de ME, esse vírus recebeu o nomenclatura de Rotavírus, e essa denominação foi aceita em 1979 pelo Comitê Internacional de Taxinomia Viral (ICTV) (SANTOS & GOUVEA, 1997).

No Brasil, o RV foi identificado pela primeira vez por Linhares e colaboradores em 1976, também por ME em amostras de fezes de crianças internadas por gastroenterite em um hospital público de Belém, Pará (LINHARES, 2000). Desde então, esse vírus foi identificado em todo o território nacional, causando infecção graves em crianças menores de 5 anos.

3.1.2 Morfologia

O RV pertence à família *Reoviridae*, do gênero *Rotavirus*. O RV é um vírus não envelopado de 70 nm de diâmetro, e possui um triplo capsídeo protéico de morfologia icosaédrica, composto por seis proteínas estruturais (VP1 a VP7) e cinco não estruturais (NSP1 a NSP5) codificadas por 11 segmentos de RNA de dupla fita de polaridade positiva. Entretanto, em algumas cepas de RV, o segmento 11 pode apresentar duas regiões abertas de leitura (Open Reading frame-ORF), a primeira codifica a proteína NSP5 e a segunda codifica a NSP6 (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996; ESTES 2001).

A camada mais externa do capsídeo viral é formada por 750 cópias de VP7 organizadas em 260 trímeros e 120 cópias de VP4 que formam 60 espículas virais. A VP7 (37 kDa) é uma glicoproteína que pode ser codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9, e corresponde a 30% do total de proteínas virais. A VP4 (88 kDa) é uma proteína não glicosilada que é codificada pelo segmento 4, e apresenta um sítio sensível à protease o qual a subdivide em VP8 e VP5. A VP8 contém a maioria dos epítomos associado à imunidade, e a VP5 é responsável pela adsorção do vírus na célula hospedeira. Além disso, a VP4 possui atividade hemaglutinante. A VP4 e VP7 são proteínas imunogênicas, e são as responsáveis pela indução da produção de anticorpos neutralizantes que resulta em uma resposta imune protetora (ESTES 2001; ALFIERI, *et al.* 2007; ESTES & KAPIKIAN, 2007).

A VP6 (41 kDa), codificada pelo segmento 6, compõe a camada intermediária do capsídeo viral, é uma proteína hidrofóbica, imunogênica e muito estável. Por apresentar essas características, essa proteína é alvo para muitos testes diagnósticos (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996).

A VP2 (94 kDa), que é codificada pelo segmento 2, forma a camada mais interna do capsídeo viral, e protege os 11 segmentos de RNA. Associada a VP2 e aos segmentos genômicos estão as proteínas VP1 e VP3, que são codificadas pelos segmentos 1 e 3, respectivamente. A VP1 (125 kDa) é uma RNA polimerase RNA dependente responsável pela replicação do genoma, e a VP3 (88 kDa) apresenta a

atividade de uma guaniltransferase e uma metilase, estando envolvida na adição do cap 5' aos RNAs mensageiros virais recém-sintetizados (ESTES 2001; ESTES & KAPIKIAN, 2007).

Entre as proteínas não estruturais destaca-se a NSP4 (20 kDa) que é codificada pelo segmento 10 e apresenta diversas funções no processo de replicação e montagem viral. Mas a sua principal função é a ação semelhante a uma enterotoxina, interagindo com um receptor celular do epitélio intestinal que desencadeia uma via sinalizadora que aumenta as concentrações de cálcio no meio intracelular, e por consequência aumenta excreção de cloro para o meio extracelular, resultando em uma diarreia por hipersecreção. A NSP4 age também sobre o sistema nervoso entérico, estimulando e aumentando a secreção de água pelas células intestinais (ZHANG *et al.*, 2000, ALFIERI *et al.*, 2007).

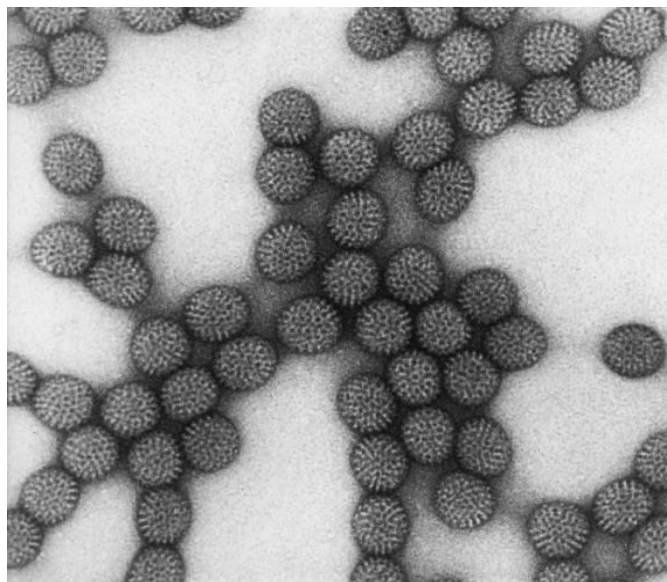


Figura 1: Microscopia eletrônica do RV. Fonte: <http://www.cdc.gov/rotavirus>.

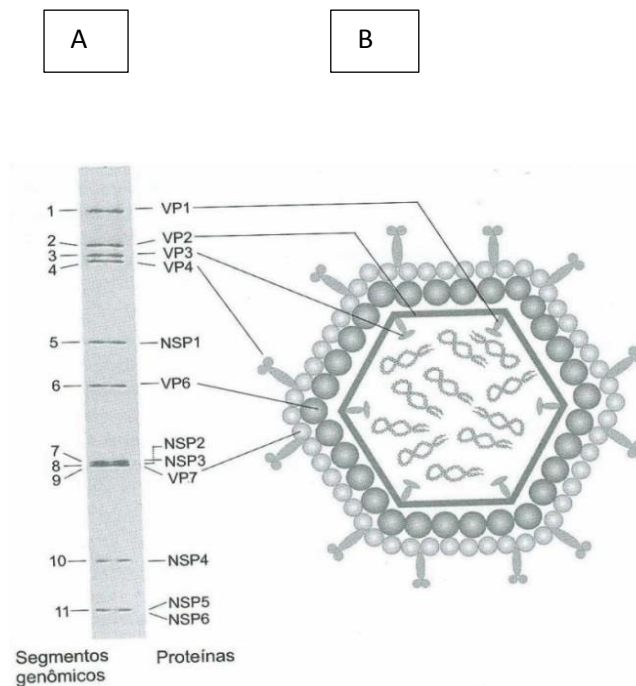


Figura 2: (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando os segmentos genômicos de RV. (B) Proteínas virais codificadas por cada segmento genômico (Adaptado de ALFIERI *et al.*, 2007).

3.1.3 Genoma

O genoma viral é codificado por 11 segmentos de RNA dupla fita de polaridade positiva. Esses segmentos são monocistrônicos, ou seja, cada segmento apresenta uma ORF que codifica uma única proteína, com exceção do segmento 11 que codifica as proteínas NSP5 e NSP6. O tamanho dos segmentos varia de 667 a 3.302 pares de bases (pb), sendo o segmento 11 o que apresenta menor massa molecular e o segmento 1 é o maior (ESTES & KAPIKIAN, 2007).

As regiões 5' dos RNAs genômicos possuem a estrutura *cap*, mas diferente do RNA mensageiro da célula hospedeira não apresenta a extremidade 3' poliadenilada. Todos os genes do RV possuem regiões não traduzidas de extensão variável próximo às extremidades 5' e 3', que flanqueiam uma única sequência ORF, com exceção do segmento 11. Quase todos os segmentos terminam com uma sequência consenso 5'-UGUGACC-3', que provavelmente seja um sinal importante

para a transcrição e transporte do RNA, e replicação e encapsidação dos segmentos genômicos (ALFIERI et al., 2007; ESTES, 2001).

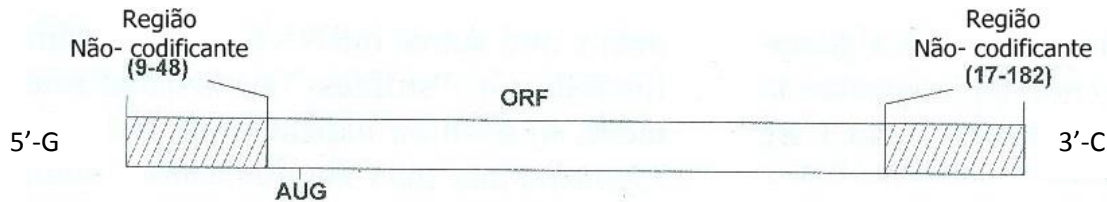


Figura 3: Organização do genoma de RV representado por 1 dos 11 segmentos de RNA dupla fita (Adaptado de ESTES, 2001)

3.1.3.1 Perfil eletroforético

Os segmentos de RNA viral podem ser separados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), gerando padrão eletroforético denominado eletroferotipo. Essa técnica oferece um método rápido e fácil de diagnóstico da infecção viral (GOUVEA e BRANTLY, 1995). Após a separação por SDS-PAGE, os 11 segmentos de RNA foram enumerados pela ordem de migração e divididos em 4 classes: A classe I é formada pelos quatro primeiros segmentos com maior massa molecular (1, 2, 3 e 4); a classe II é composta por dois segmentos de massa molecular média (5 e 6); a classe III é formada por três pequenos segmentos (7, 8 e 9); e a classe IV é formada pelos segmentos que apresentam menor massa molecular (10 e 11) (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996; ALFIERI et al., 2007).

Além da caracterização dos eletroferotipos virais através do perfil de migração dos segmentos de RNA genômicos, a análise da mobilidade eletroforética por PAGE também permite a visualização de diferentes perfis eletroforéticos determinados pela posição do segmento 11 no gel. Quando o segmento 11 migra mais rápido e se localiza após o segmento 10, é caracterizado o perfil eletroforético “longo”, Quando o

segmento 11 migra mais devagar que o usual, e se localiza entre os segmentos 9 e 10, é determinado o perfil eletroforético “curto”. “Quando o segmento 11 migra mais lentamente do que o perfil curto, é denominado o perfil eletroforético “super curto” (ESTES, 2001; ESTES & KAPIKIAN, 2007)”.

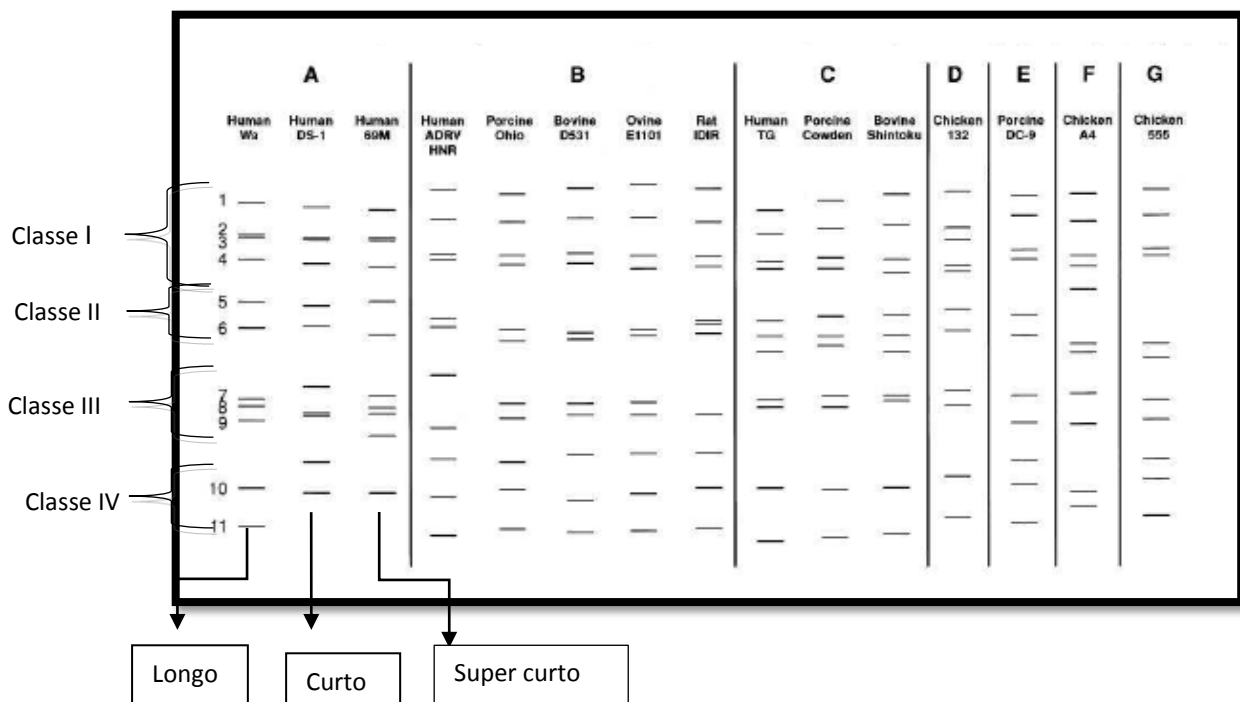


Figura 4: Ilustração esquemática do padrão de migração dos segmentos genômicos do RV pertencentes aos eletroferogrupos A-G, após eletroforese em gel de poliácridamida. (Adaptado de KAPIKIAN *et al.*, 2001).

3.1.3.2 Rearranjo gênico e mutação

A variabilidade molecular e antigênica do RV é decorrente de três mecanismos genéticos: mutações pontuais, rearranjos gênicos e “*reassortments*” (ressortimento). As mutações pontuais consistem em alterações na sequência de nucleotídeos que ocorrem durante a replicação do genoma e que resultam em substituição de

aminoácidos na proteína. Essas mutações podem ser causadas principalmente pela enzima RNA polimerase RNA dependente (VP1), que não apresenta a capacidade de revisão e correção dos nucleotídeos incorporados (*proofreading*), resultando em alterações nos sítios gênicos que podem gerar cepas resistentes aos anticorpos neutralizantes (ESTES,2001 , GOUVEA & BRANTLY, 1995).

Rearranjos são alterações nas sequencias de nucleotídeos localizadas em porções importantes do segmento genômico, que podem ser deleções ou duplicações. Essas modificações acarretam mudança na massa molecular dos segmentos de RNA viral, resultando em um perfil eletroforético ou eletroferotipo diferentes que podem ser evidenciado pela separação dos segmentos genômicos pela técnica de SDS- PAGE (ESTES & KAPIKIAN, 2007).

O *reassortment* é uma forma de recombinação gênica que ocorre em vírus de genoma segmentado, decorrente de troca de segmentos genômicos por cepas diferentes. Essa troca acontece quando um célula é co-infectada por duas cepas virais distintas, resultando em uma progênie viral contendo diferente combinações dos genes das cepas parentais. A presença da sequencia consenso (5'-UGUGACC-3') na maioria dos segmentos de RNA viral permite a ocorrência desse fenômeno. Por meio desse mecanismo, novas cepas virais podem surgir rapidamente (ALFIERI *et al.*, 2007; GOUVEA & BRANTLY, 1995).

3.1.4 Classificação

O RV possui duas classificações: a primeira foi baseada na característica eletroforetica do RNA genômico; e a segunda através de estudos moleculares de suas proteínas estruturais VP6, VP4 e VP7.

Por apresentarem massas moleculares diferentes, após uma eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), cada segmento de RNA genômico vai se localizar em uma

posição distinta no gel, resultando em um perfil de migração. A análise dos diferentes perfis de migração possibilitou a classificação do RV em sete eletroferogrupos, denominado de A a G. Entretanto, a determinação do eletroferogrupo não deve ser utilizada como o único método de classificação do RV, pois alterações no genoma viral podem resultar em diferentes padrões de migração dos segmentos de RNA viral (ALFIERI *et al.* 2007; ESTES & KAPIKIAN, 2007).

A partir da análise antigênica da proteína VP6 foi possível classificar o RV em 7 grupos, que foram denominados de A a G. Os grupos A, B, C são responsáveis por causar infecção em humanos e animais, enquanto que os grupos de D a G foram identificados exclusivamente em animais. Entre os grupos que infectam humanos, o grupo A é o mais preponderante nos casos gastroenterite por RV no mundo, sendo o grupo B identificado principalmente na China, e o grupo C já foi relatado esporadicamente em vários países. Através de estudos com o determinante antigênico presente na VP6 foi possível dividir o grupo A em quatro subgrupos determinados por I, II, I+II e não I e não II (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996; ESTES, 2001).

Além da classificação em grupos e eletroferotipos, o RV grupo A foi também diferenciado em sorotipos através de estudos de neutralização viral em cultura de células; e em genótipos a partir de análise do RNA viral por técnica de amplificação, sequenciamento ou técnica de hibridização molecular (SERRAVALLE, 2004).

Estudos moleculares com as proteínas estruturais classificou o RV em: genótipos G através da VP7, que foi assim denominado por se tratar de uma glicoproteína, e em genótipos P através da VP4, que é uma proteína sensível à protease e por isso foi denominado de "P". Análise molecular e genômica da VP7 identificou 15 genótipos/sorotipos G, e entre eles 10 são responsáveis por causar infecções em humanos (G1 a G6, G8-G10 e G12). No entanto, estudos com a VP4 encontrou 25 genótipos e 14 sorotipo, sendo P1[8], P1[4], P2[6], P3[9], P3[13], P4[10], P5[3] e P8[11] os mais detectados em humanos (PARASHAR, *et al.*, 2006; LEITE, *et al.* 2008).

Por tanto, a classificação do RV é determinada pelo conjunto de informações moleculares de suas proteínas estruturais VP6, VP7 e VP4, e a análise dessas proteínas classifica cada cepa analisada em grupos, em genótipos G e genótipos P, como no exemplo: a cepa de RV humano Wa pertence ao grupo A, subgrupo II, genótipo G1 e genótipo P1A[8] (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996; ESTES, 2001, ANGEL *et al.*, 2007). Entretanto, a partir de abril de 2008, um novo modelo de classificação e nomenclatura para o RV foi proposto baseado na análise de todos os segmentos genômicos. Esse sistema atribuiu um genótipo para cada segmento de RNA: onde VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5 corresponde respectivamente a Gx-P[x]-IX-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008).

Para o grupo responsável pela classificação do RV (The Rotavirus Classification Working Group- RCWG), como os 11 segmentos de RNA viral podem sofrer recombinações independentes e cada um desempenha um papel fundamental na geração de diversidade do RV, um sistema de classificação baseado na análise de todos os segmentos genômicos seria o mais desejável, pois ajudaria a determinar quais os genes influenciam na interação com hospedeiros, na replicação e na virulência, a elucidar questões como eventos zoonóticos, *reassortment*, epidemiologia e evolução do RV (MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008; MATTHIJNSSENS *et al.*, 2011)

3.1.5 Ciclo de replicação

O RV infecta principalmente as células diferenciadas do topo das vilosidades do intestino delgado. Estudos demonstram que a infectividade de algumas cepas de RV dependem da presença do ácido siálico (AS) na superfície celular, entretanto, também foram identificadas moléculas independentes da presença AS. Dessa forma, dois receptores para o RV foram propostos: os AS-dependentes, que são gangliosídeos; e os AS-independentes, que são integrinas (ALFIERI *et al.*, 2007; RUIZ *et al.*, 2009).

A interação inicial com a célula (Adsorção viral) é dependente de concentrações de sódio e ocorre na faixa de pH de 5,5 até 8. E essa primeira interação é mediada após a clivagem proteolítica da VP4 e exposição do peptídeo de fusão VP5. Estudos mostram que somente as partículas contendo a VP4 em sua superfície são capazes de interagir com a célula hospedeira produzindo uma replicação produtiva. A VP7 também apresenta um papel importante nesse processo de interação com a célula hospedeira, pois aperfeiçoa a interação da proteína VP5 (ESTES, 2001, KAPIKIAN & CHANOCK, 1996).

As partículas são internalizadas entre 60 a 90 minutos, e pode ocorrer por dois mecanismos: endocitose ou penetração direta com a membrana. Após a adsorção a partícula viral é desnudada, perdendo a camada externa, e passa a ser chamada de DLP (partícula viral de duas camadas). Nesse momento ocorre a ativação da replicação e transcrição viral, que são mediadas pela VP1 (RNA polimerase-RNA dependente) associada a VP3 (guaniltransferase). Esse processo ocorre no citoplasma, em estruturas denominadas viroplasmas, onde a DLP se mantém íntegra (ESTES & KAPIKIAN, 2007; ALFIERI *et al.*, 2007).

O RV possui todas as enzimas necessárias para o processo de transcrição do RNA mensageiro com o cap 5', incluindo a transcriptase, nucleotídeo fosfohidrolase, guaniltransferase e metilase. A transcrição é um processo assimétrico, onde todos os transcritos são de polaridade positiva produzida a partir da fita negativa do RNA dupla fita viral. Esse processo ocorre dentro das DLPs e requer a forma hidrolisável da Adenina Trifosfato (ATP). Os RNAs mensageiros recém-transcritos apresentam duas funções: atuam como mensageiros na síntese das proteínas virais, e atuam como molde para síntese da fita de polaridade negativada da dupla fita de RNA que será o genoma da progênie viral (ESTES 2001; ALFIERI *et al.*, 2007).

O RNA mensageiro viral possui o cap 5' mas não possuem a cauda poliadenilada. Apesar disso, a tradução é mediada pelo o mecanismo de síntese de proteínas celular, através dos ribossomos livres no citoplasma. Apenas a VP7 e NSP4, que são glicoproteínas, são produzidas pelos ribossomos ligados ao retículo endoplasmático rugoso (RER). Dessa forma todas as proteínas estão localizadas no

viroplasma, com exceção da VP7 e NSP4 que estão no REG, e da NSP1 e NSP3 que estão ligadas as fibras do citoesqueleto (ESTES & KAPIKIAN, 2007).

A replicação é um processo semiconservativo, onde os transcritos que são de polaridade positiva também servem como molde para fitas negativas, e essa nova fita sintetizada permanece ligada a fita positiva formando a dupla fita. Após a síntese o RNA dupla fita permanecem ligado às partículas subvirais, não sendo encontrado RNA genômicos livres na célula (ESTES, 2001; RUIZ *et al.*, 2009).

A morfogênese viral está associada ao processo de replicação, e ocorre a formação de pelo menos três estágios intermediários de replicação (IR), que são os precursores das partículas de duplo capsídeo: IR pré-core, IR-core, e IR-VP6. Após a sua formação o IR-VP6 é acrescido pela VP4, e passa do viroplasma para o interior do RER, onde ocorre o processo de maturação. A maturação final é dependente de altas concentrações de cálcio, que promove a estabilização das proteínas no capsídeo. Durante esse processo, as partículas virais adquirem uma bicamada lipídica que serve como envelope. O envelope é removido pela NSP4 dentro do RER, e em seguida a VP7 é adicionada para formar a partícula viral madura composta por três camadas proteicas (ESTES & KAPIKIAN, 2007).

Estudos com ME demonstram que o vírus é liberado através da lise celular. Mas, foi também observado que o vírus de dupla e/ou tripla camada permanece ligado aos restos celulares, sugerindo que essas partículas interagem com estruturas celulares como citoesqueleto e membrana (ALFIERI *et al.*, 2007; RUIZ *et al.*, 2009).

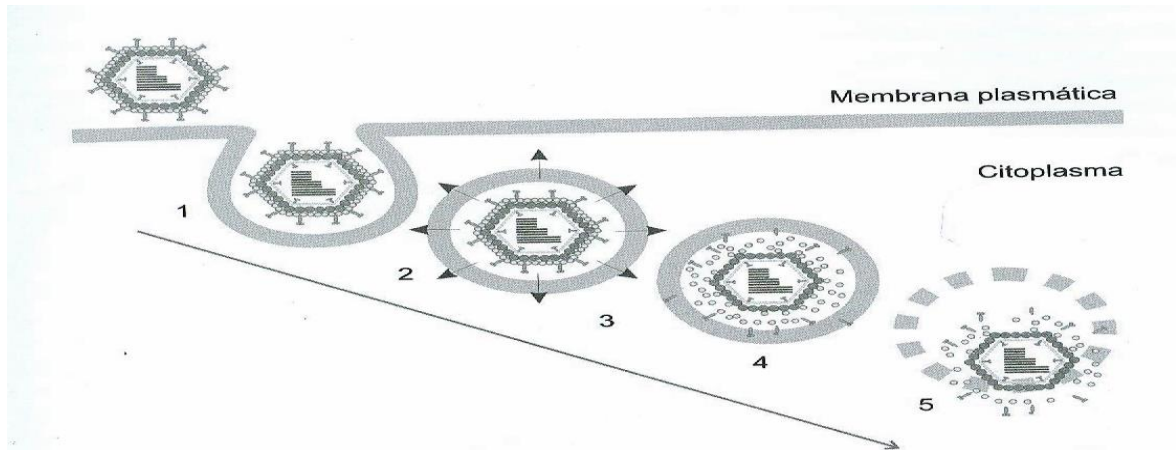


Figura 5: Modelo para penetração do RV em células suscetíveis por meio de endocitose (Adaptado de ALFIERI *ET al.*, 2007).

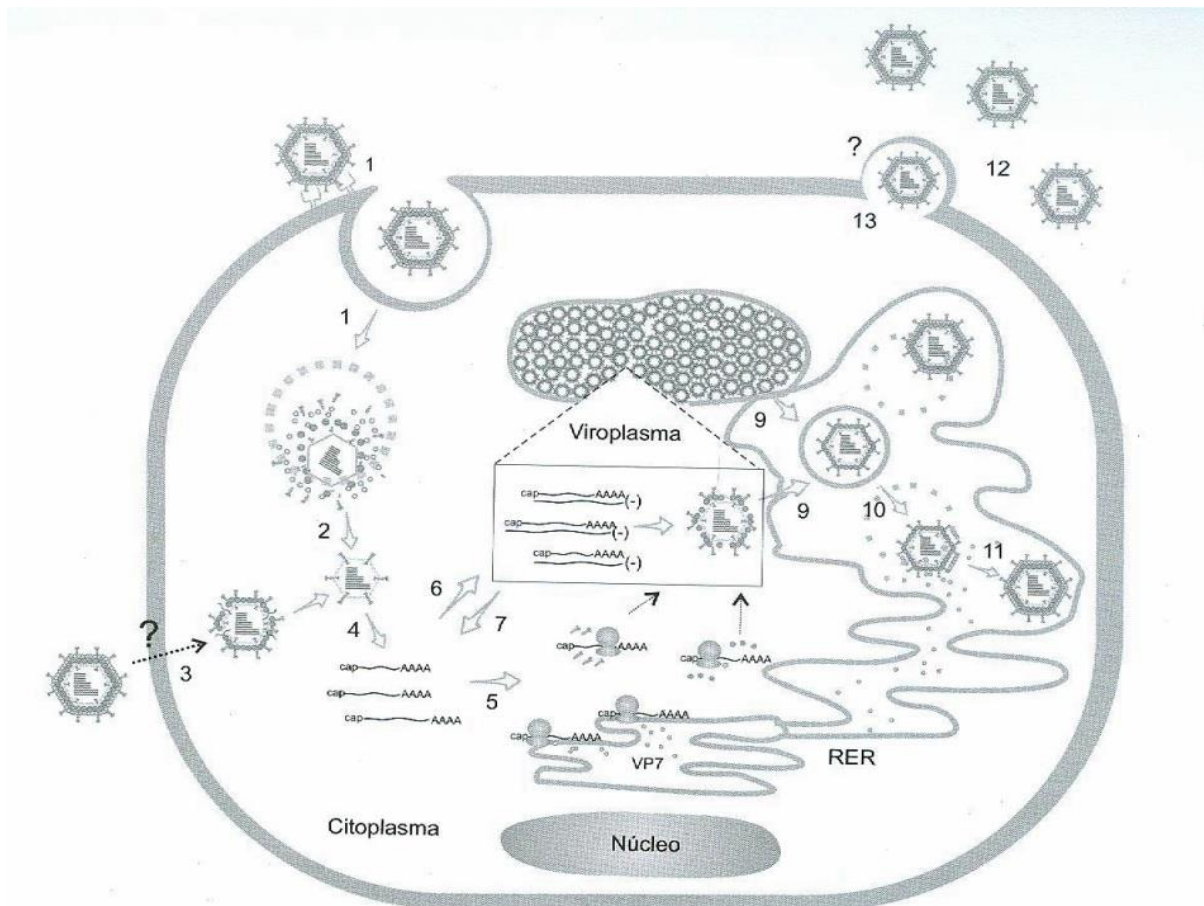


Figura 6: Ciclo replicativo do RV (Adaptado de ALFIERI *et al.*, 2007).

3.2 PATOGÊNIA E SINAIS CLÍNICOS

A transmissão do RV ocorre principalmente pela via oral-fecal, através da ingestão de partículas virais presente na água, alimentos e fômites contaminados com fezes. Alguns estudos sugerem uma possível transmissão através do via respiratória. Essa forma de contágio é evidenciada pela presença do vírus no trato respiratório superior, e pela ocorrência de sintomas respiratórios em alguns pacientes com gastroenterite por RV, mas a via respiratória não é considerada um modo usual de transmissão (ESTES & KAPIKIAN, 2007; ALFIERI *et al.* 2007; CHANDRAN *et al.*, 2010).

O RV possui tropismo pelas enterócitos maduros do intestino delgado, localizados na região apical das vilosidades intestinais. Após adsorção, é iniciado o ciclo replicativo nos enterócitos que resulta na lise celular e liberação dos vírions. Os vírus liberados irão infectar outros enterócitos, contribuindo para propagação da infecção. Em consequência da grande injúria tecidual, a reposição celular é realizada por células cubóides provenientes das criptas intestinais que são imaturas no ponto de vista estrutural e funcional. Quando o número de enterócitos infectados é maior do que o mecanismo de reposição celular, é observada a atrofia das vilosidades. Em decorrência das lesões no epitélio intestinal, mediadores inflamatórios são liberados comprometendo a mobilidade das células da cripta e a motilidade intestinal que pode ser inibida durante o episódio de diarreia (BRICKS, 2005; WEISBERG, 2007; KAPIKIAN *et al.*, 2007).

A infecção por RV pode apresentar um período de incubação de no máximo 48 horas, e logo após surgem os primeiros sintomas de diarreia, associado a vômitos, dores epigástricas, náusea, febre e desidratação severa que pode evoluir para o óbito. Em adultos a infecção por RV maioria das vezes é assintomática. Em neonatos, por causa da alta prevalência de anticorpo materno sugere-se que a infecção é subclínica ou ocorre na forma de diarreia branda. Entretanto crianças de 6 a 24 meses de idade são apontadas como o grupo mais susceptível á forma grave dessa doença, sendo considerada uma importante causa de mortalidade infantil nessa faixa etária. Entretanto, a partir dos 2 anos é observada a diminuição da

prevalência da gastroenterite por RV em crianças, devido a algum episódio de infecção assintomática ou não que resultou em uma resposta imune protetora (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996; SANTOS & GOUVEA, 1997;; ALFIERI *et al.*, 2007).

Apesar de a desidratação ser a principal complicação desse processo infeccioso, causando 90% das mortes associadas a esse patógeno, a infecção por RV geralmente evolui para cura espontânea. Essa infecção viral não possui tratamento específico sendo administrado o mesmo tratamento adotado nos casos de doenças diarreicas agudas, apenas medidas paliativas como hidratação e nutrição, e não é recomendado o uso de antibióticos ou antidiarreicos. (KAPIKIAN *et al.*, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; CHANDRAN *et al.*, 2010).

3.3 EPIDEMIOLOGIA

Dados de estudo epidemiológicos sugerem que o RV é o responsável pela a maioria dos casos graves de gastroenterites em crianças no mundo inteiro, acometendo com mais severidade bebês de 6 a 24 meses de idade. Estimasse que ocorram no mundo por ano 114 milhões de episódios de gastroenterite por RV, 2.400.000 hospitalizações a cada ano. Em 2004 foram mais de 500 mil mortes atribuídas ao RV, representando 5% de todas as mortes de crianças até 5 anos de idade nesse ano (PARASHAR *et al.*, 2003; CHANDRAN *et al.*, 2010).

A rotavirose apresenta alta prevalência tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. Nos países desenvolvidos, apesar dessa infecção apresentar uma alta frequência, os índices de mortalidade são baixos, e o RV é responsável por 60.000 a 70.000 hospitalizações de crianças por ano, que representam um custo de 400.000 milhões de dólares. Contudo, nos países em desenvolvimento é observado um maior índice de mortalidade infantil, e estimasse que ocorram aproximadamente 100.000 milhões de casos e cerca de 600.000 mortes associados ao RV nesses países por ano. Além disso, o RV é o agente causal de 25% a 55% das hospitalizações por diarreia em crianças menores que 5 anos em países da América latina, Ásia e África. E 86% do total de mortes por RV

ocorrem na Ásia e na África subsaariana (BRICKS, 2005; ESTES & KAPIKIAN, 2007).

Estudos sobre a sazonalidade demonstram que existe um aumento no número de casos de rotavirose nos meses mais frios nas regiões de clima temperado, que pode estar associado à baixa umidade relativa e maior permanência da população em ambientes fechados decorrente da diminuição da temperatura. Entretanto nas regiões tropicais, a sazonalidade não é tão marcante, manifestando-se pela constante prevalência da gastroenterite por RV durante todo o ano (OLIVEIRA, *et al.*, 2010).

Entre os grupos de RV estudados, apenas o grupo A, B e C infectam humanos. Desde sua primeira identificação, o grupo A é apontado como o principal agente causal de gastroenterite no mundo, sendo o responsável por 90% do total dos casos diagnosticados. As infecções pelo RV do grupo B são menos comuns e ocorre principalmente na China. O grupo C é responsável por surtos esporádicos em todo o mundo (SANTOS & HOSHINO, 2005; PARASHAR *et al.*, 2006).

A epidemiologia dos genótipos e sorotipos do grupo A é muito complexa, havendo predominância de alguma cepa, os quais podem variar de país para país, de região a região ou até mesmo de ano para ano. Com tudo, em relação ao genótipo “G”, o G1 é apontado como o mais prevalente em todos os continentes, sendo G1 a G4 mais detectados na Ásia, América do norte e Europa, e G5, G8 e G9 os mais frequentes na América do Sul, Austrália e África. E entre os sorotipos e genótipos “P”, o sorotipo 1 e as cepa P[8] e P[4] são os mais prevalentes no mundo. Dados epidemiológicos mundiais apontam G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8], G9P[6] como os principais responsáveis pelos casos de gastroenterite por RV (ANGEL *et al.*, 2007, ESTES & KAPIKIAN, 2007; MUKHERJEE & CHAWLA-SARKAR, 2011).

No Brasil, entre o período 2006 a 2009, o RV foi o responsável por 30% total de casos de diarreia agudas em relação aos outros vírus entéricos em crianças menores que cinco anos, sendo que a frequência dessa infecção varia nos diferentes estados, e apresenta um aumento na incidência de casos entre os meses

de maio a setembro nas regiões Central e Sudeste, mas é constante durante todo o ano no Norte e Nordeste. Entre os genótipos circulantes identificados, o G1P[8] é o de maior circulação em todo o Brasil, seguido de G9P[8], G2P[4] e o G3P[x] (LINHARES, 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005, OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Na Bahia o RV pode ser o responsável por até 20% dos casos de gastroenterites notificados em crianças menores que cinco anos. E os estudos realizados por Campos e colaboradores (2002) e Serravalle e colaboradores (2006) encontraram o RV do grupo A associado ao genótipo G9 como o principal agente causal de gastroenterite na cidade de Salvador desde 1999.

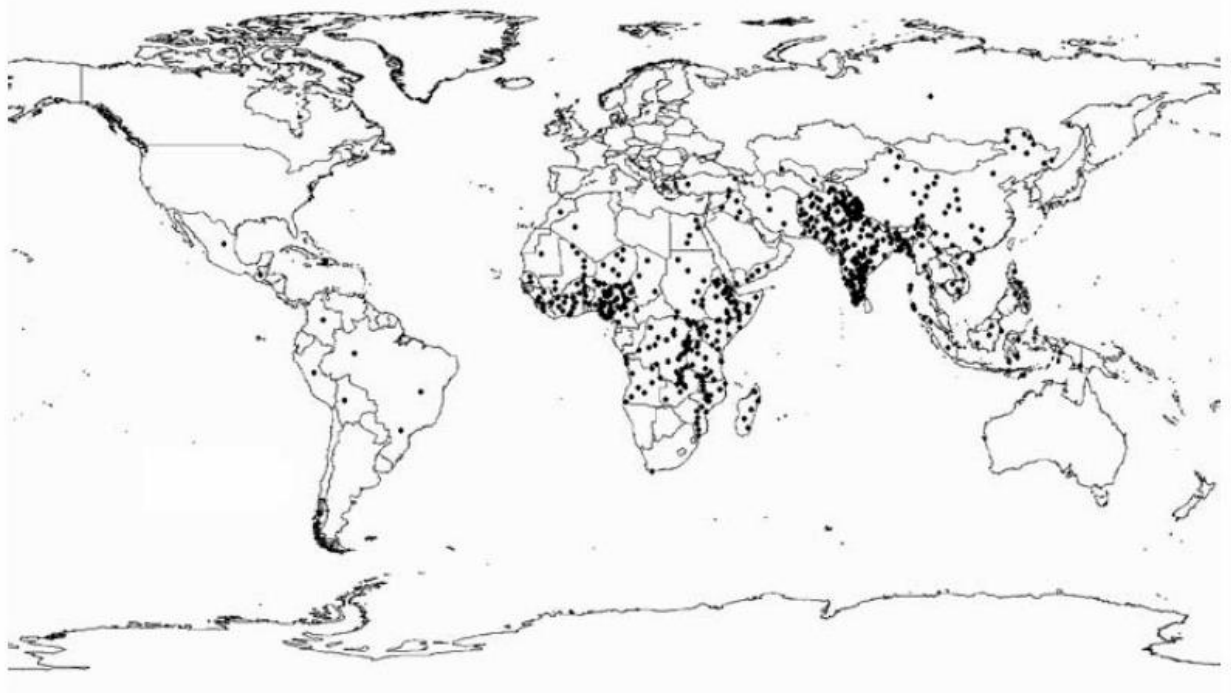


Figura 7: Estimativa global das mortes por gastroenterite associada ao RV (Adaptado de PARASHAR, *et al.*, 2006).

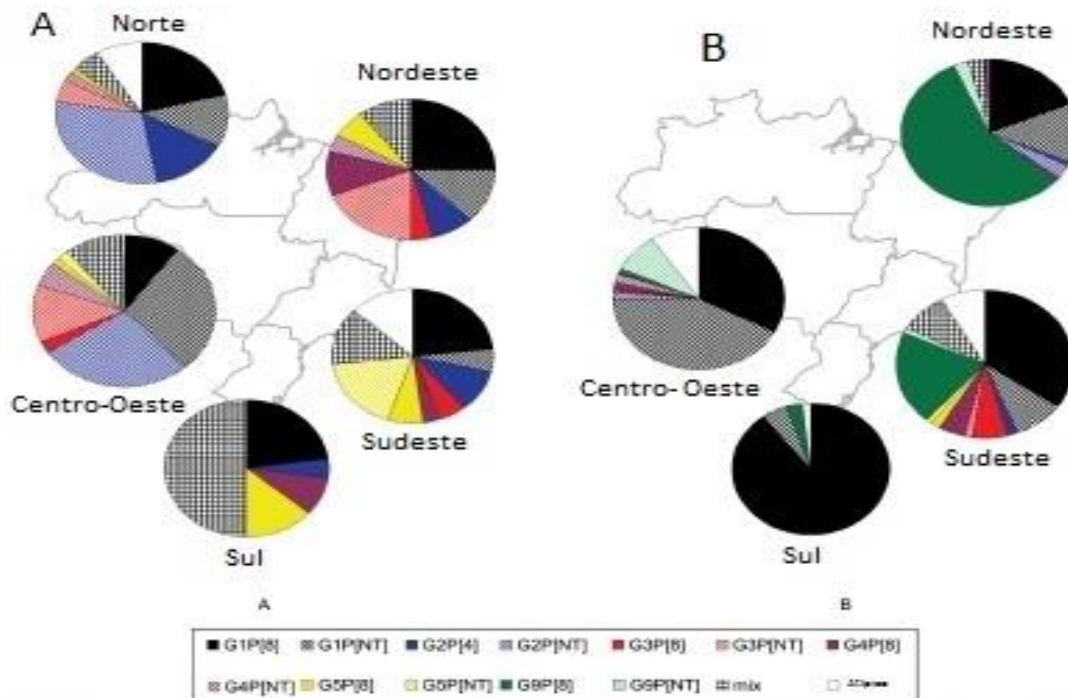


Figura 8: Distribuição dos genótipos de RV nas regiões do Brasil. (A) 1982-1995 (B) 1996-2005 (Adaptado de LEITE *et al.*, 2008).

3.4 RESPOSTA IMUNE

A infecção natural por RV pode conferir imunidade e parece estar associado a mecanismos imunológicos e não imunológicos (BRICKS, 2005). Os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta a infecção por esse vírus ainda não estão totalmente esclarecidos. No entanto a resposta imunoprotetora contra o RV tem curta duração, uma vez que as reinfecções são frequentes, mas estas são geralmente assintomáticas ou resultam em um quadro de diarreia mais branda (SANTOS e GOUVEA, 1997).

As proteínas do capsídeo VP6, VP4 e VP7 induzem a produção de anticorpos IgG neutralizantes, mas as funções específicas dessa classe de anticorpo ainda não foram esclarecidas. No entanto as imunoglobulinas IgA, responsáveis pela imunidade de mucosas, constituem na principal forma de defesa contra a infecção intestinal causada por esse vírus. Estas imunoglobulinas são anticorpos não neutralizantes dirigidos contra a proteína VP6, e inativam os vírus dentro das células

epiteliais, durante o processo de transcitose. Altos níveis de IgA secretora nas superfícies das mucosas oferecem proteção contra a reinfecção sintomática. Também foi descrito o importante papel das IgGs neutralizantes de origem materna na proteção de neonatos contra a gastroenterite por RV (ANGEL *et al.*, 2007 ALFIERI *et al.*, 2007).

Após a infecção natural, apenas 38% das crianças apresentam imunidade completa contra reinfecção. A presença de IgM sérica específica é detectada 7 dias após a infecção natural ou a imunização, e a IgA secretora específica é detectada na saliva, no suco duodenal e nas fezes após 7 a 28 dias. O aumento nos títulos de anticorpos séricos das classes IgA e IgG é observado após 20 dias (BECKIS, 2005).

Apesar de imunidade celular apresentar grande importância na eliminação das infecções virais, para resposta contra a infecção por RV seus mecanismos não foram totalmente esclarecidos, mas parece estar mais relacionada com a recuperação clínica do enfermo do que com a prevenção da reinfecção. Estudos utilizando o camundongo como modelo experimental demonstrou que: a) os anticorpos específicos contra o RV são de importância primária para a proteção contra a reinfecção; b) cepas homólogas de RV induzem mais a resposta imune humoral que as cepas heterólogas; c) os linfócitos T CD8₊ apresentam um papel crucial na resolução da enfermidade; d) citocinas e células natural killer também são responsáveis pela eliminação do vírus (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996; ESTES & KAPIKIAN, 2007).

Por apresentar atividade semelhante a uma enterotoxina, em estudos com a proteína não estrutural NSP4 foi observado que ela estimula a resposta imune humoral e celular, com a participação dos linfócitos T citotóxicos. Mas essa resposta imune mediada por NSP4 não é fundamental para o controle da infecção por RV (ANGEL *et al.*, 2007).

3.5 VACINA

A alta prevalência da gastroenterite por RV em países desenvolvidos e em desenvolvimento demonstra que apenas medidas de higiene sanitárias não são suficientes para controlar essa infecção. Dessa forma, vários estudos foram propostos com o objetivo de criar uma vacina eficaz contra os diversos genótipos promovendo o controle da diarreia por RV em crianças (LINHARES, 2000).

Para uma vacina contra o RV ser realmente eficaz ela precisa apresentar algumas características: a) ser administrada de forma oral b) ter o público alvo crianças com até 2 anos, pois nesse grupo a infecção é mais severa c) capacidade de promover imunidade local, induzindo a produção de IgA intestinal d) oferecer imunidade contra os principais genótipos circulantes (G1 a G4) e) promover proteção duradora contra a infecção (ESTES & KAPIKIAN, 2007).

Baseado nesses princípios, em 31 de agosto de 1998 foi licenciada pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, a primeira vacina contra o RV denominada RotaShield® desenvolvida pelo Instituto Nacional de Saúde e Laboratórios Wyeth (Wyeth Laboratories, Monmouth Junction, NJ). Era uma vacina tetravalente produzida a partir de recombinação do RV humano e RV *rhesus*, e foi administrada em crianças em três doses no 2º, 4º e 6º meses de idade. No entanto, a partir de julho de 1999 o Center for Disease Control (CDC), começou a notificar caso de intussuscepção (invaginação de uma porção do intestino em outra porção adjacente que pode levar a obstrução intestinal) em crianças que foram imunizadas com essa vacina e suspendeu a sua comercialização. Após a sua suspensão, muitos trabalhos demonstraram a relação da RotaShield® com os casos de intussuscepção. Depois da retirada da RotaShield® novas vacinas foram desenvolvidas e algumas foram licenciadas e estão disponíveis no mercado (ANGEL *et al.*, 2007; CHANDRAN *et al.*, 2010; MUKHERJEE & CHAWLA-SARKAR, 2011).

Em 2004 foi licenciada a Rotarix®, que foi desenvolvida pelo grupo GlaxoSmithKline (GlaxoSmithKline, Genval, Belgica). Essa vacina é monovalente composta por cepa de RV humano G1P[8] isolado de uma amostra de fezes de uma criança diagnosticada com a gastroenterite durante um ensaio clínico de uma vacina contra o RV em 1988. No entanto a vacina testada neste estudo foi considerada ineficaz, mas observações subsequentes mostraram que as crianças naturalmente infectadas com essa cepa circulante apresentaram proteção contra as infecções subsequentes. Além disso, foi observado que os anticorpos produzidos durante essa infecção foram capazes de neutralizar os genótipos G1 a G4. Dessa forma, esta cepa foi atenuada em cultivo celular e utilizada para a produção da vacina. A Rotarix® deve ser administrada por via oral em duas doses em crianças de 6 a 24 meses. Essa vacina foi licenciada no Brasil em julho de 2005 pela Agencia de Vigilância Sanitária (ANVISA), e em março 2006 foi introduzida no calendário básico de imunizações para crianças (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; GLASS *et al.*, 2006 CHANDRAN *et al.*, 2010; MUKHERJEE & CHAWLA-SARKAR, 2011).

Em 2006 foi licenciada a Rotateq® que foi desenvolvida pelo grupo Merck (Merck and Co. Whitehouse Station, NJ). Essa vacina é composta por 5 diferentes RV humano-bovino recombinante, os quais apresentam proteínas de superfície de cepas humanas associado com proteínas de cepas bovinas. Essa vacina promove proteção contra os genótipos G1 a G4 e P8, e deve ser administrada por via oral em bebês entre 6 a 32 semanas, em um esquema de 3 doses com um intervalo de 4 semanas entre cada dose (GLASS *et al.*, 2006; CHANDRAN *et al.*, 2010).

A LLV, uma vacina resultante da atenuação de uma cepa animal G10P[12] em cultivo celular. Após 37 passagens, o vírus foi testado em vários ensaios clínicos, e em 2000 essa vacina foi licenciada pela China Drug Inspection e Management Bureau. A LLV é administrada em uma única dose oral em crianças com idade entre 2 a 36 meses, seguido por um reforço anual. No entanto, a vacina é relativamente cara na China, por isso poucas crianças receberam mais de uma dose, e não é rotineiramente utilizado no programa nacional de imunização da China (CHANDRAN *et al.*, 2010, MUKHERJEE & CHAWLA-SARKAR, 2011).

3.6 DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS

Os sintomas da infecção por RV são semelhantes aos de gastroenterite causada por diversos outros patógenos, por isso não é suficiente para permitir um diagnóstico. Assim, o diagnóstico diferencial se faz necessário e pode ser realizado através da pesquisa do vírus ou de suas proteínas, ou pela identificação da resposta imunológica. O RV pode ser detectado nas fezes até quarto dia após o início dos sintomas, onde acontece maior excreção viral. No entanto, os anticorpos IgM apresentam alta titulação até o sétimo dia, e o os IgG e IgA após 20 dias do início da infecção.

3.6.1 Detecção das partículas virais

A partícula viral pode ser detectada através de amostras de fezes ou corte histológicos do epitélio intestinal através da técnica de microscopia eletrônica. Porém, por apresentar alto custo e necessidade de profissional altamente treinado, o seu uso está restrito pelos laboratórios de pesquisa.

3.6.2 Detecção sorológica

A detecção das diferentes classes de anticorpos responsáveis pela resposta imune anti- RV pode ser realizada por diversas técnicas como Imunofluorescência, reação de neutralização ou inibição, hemaglutinação, fixação de complemento, mas a mais empregada e também utilizada em kit de diagnósticos comerciais são os ensaios imunoenzimático como o ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*).

3.6.3 Isolamento Viral

O RV pode ser cultivado em linhagem de células MA-104 (células de rim de macaco) e CaCo-2 (células de carcinoma de cólon humano). Entretanto, por ser um pouco demorado e custoso, o isolamento viral não é utilizado como diagnóstico, mas é amplamente utilizada em laboratórios de pesquisa.

3.6.4 Detecção do antígeno viral

O antígeno viral pode ser detectado nas fezes através das técnicas ELISA e aglutinação em látex. Essas técnicas estão disponíveis em forma de kits diagnósticos específicos para o RV do grupo A. Porém, não são capazes de diferenciar o sorotipo responsável pela infecção, e baseiam se na reação antígeno-anticorpo específica para a proteína VP6.

3.6.5 Diagnóstico Molecular

3.6.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

A técnica de PAGE foi uma das primeiras a serem utilizadas para diferenciação e classificação do RV, e até hoje ela continua sendo uma metodologia importante nos estudos epidemiológicos desse vírus. Os 11 segmentos de RNA genômicos apresentam massa molecular diferente e por isso podem ser separados no gel de poliacrilamida. E após a coloração com nitrato de prata é possível observar o perfil

eletroforético específico para cada grupo. Além disso, através do perfil eletroforético é possível identificar variações no genoma viral decorrente de eventos mutacionais, e também permite a observação de infecções mistas.

3.6.5.2 Reação de Transcriptase Reversa (RT) e Reação em Cadeia da polimerase (PCR)

A técnica de RT associado a PCR permite a amplificação dos segmentos genômicos do RV, e por isso é muito utilizada em estudos de genotipagem, sequenciamento, clonagem, expressão e análise por enzimas de restrição.

Por ser um vírus de RNA, na primeira etapa de genotipagem do RV é realizada a reação de RT, onde o RNA genômico é convertido em um DNA complementar (cDNA), utilizando como o molde a fita de RNA alvo, iniciadores específicos para esse segmento e a enzima Transcriptase reversa. Após essa reação, é realizado um primeiro PCR com o objetivo de amplificar o cDNA gerado na RT, utilizando a enzima DNA polimerase e os iniciadores específico. Essa primeira etapa pode ser realizada separadamente, onde primeiro ocorre à reação de RT e depois a PCR em momentos diferentes, ou as duas reações podem ser realizadas no mesmo momento, onde o ciclo de RT será seguida do ciclo de PCR (RT-PCR).

Para a identificação dos genótipos de RV é realizada um segundo PCR (Nested-PCR). Nessa etapa serão utilizados iniciadores genótipos- específicos que irão se ligar em diferentes regiões do cDNA amplificado na RT-PCR, gerando amplicons de diferentes pesos moleculares permitindo a identificação dos genótipos circulantes. A genotipagem viral é de fundamental importância nos estudos epidemiológicos, pois permite a identificação dos genótipos circulante. Além disso, essa metodologia também tem sido aplicada em diagnósticos, visto que mais sensível e específica do que a sorotipagem. Porém no caso do RV, como o RNA tem que ser extraído diretamente de amostras de fezes, a reação de amplificação algumas vezes é mal sucedida devido à presença de RNAses, DNAses e inibidores da polimerase.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM

No período de abril a julho de 2010, foram coletadas amostras de fezes de 90 casos de crianças com até 10 anos de idade internadas com quadros de gastroenterites (Serviço ambulatorial do Hospital Aliança- Salvador, BA). Após análise pelo laboratório de diagnóstico do referido hospital, esse material foi cedido ao Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências da Saúde-UFBA e armazenado a -70°C até a realização do estudo.

4.2 TESTE IMUNOENZIMÁTICO- ELISA

As 90 amostras coletadas foram primeiramente submetidas a detecção do RV nas fezes pela técnica de ELISA Ridascreen Rotavírus (R-Biopharm, Alemanha), segundo as instruções do fabricante.

4.3 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

O RNA viral foi extraído de fezes utilizando o kit QIAmp viral RNA (QIAGEN, Alemanha) segundo as instruções do fabricante. Após a extração, esse material foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), e a Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR).

4.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

A técnica de SDS-PAGE foi realizada para caracterizar os eletroferotipos do Rotavírus. O RNA extraído (Materiais e métodos 5.3) foi acrescido do tampão desnaturante de Laemmli, e submetido à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida composto por um gel concentrador (4%) e um gel separador (7.5%), a uma voltagem de 100V por 2 horas. Posteriormente, o gel foi fixado em uma solução de etanol 10% e ácido acético 0,5%, e logo, corado com uma solução de nitrato de prata, permitindo a visualização das bandas correspondentes aos segmentos de RNA viral.

4.5 GENOTIPIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

O RNA viral extraído das fezes (n=50) foi submetidas à reação em cadeia da polimerase para amplificação do segmento 9 e segmento 4 que codificam as proteína VP7 e VP4 respectivamente. Posteriormente foi realizado o nested-PCR para a identificação dos genótipos G e P, para essas reações foram utilizados iniciadores representados nos quadros a seguir:

INICIADORES	GENÓTIPO	PROTEÍNA	SEQUÊNCIAS 5'- 3'	REFERÊNCIA
Beg9b	G	VP7	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	GOUVEA <i>et al.</i> , 1990
End9b	G	VP7	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	GOUVEA <i>et al.</i> , 1990
Con3	P	VP4	TGGCTTCGCTCATTATAGACA	GENTSCH <i>et al.</i> , 1992
Con2	P	VP4	ATTCGGACCATTATAACC	GENTSCH <i>et al.</i> , 1992

Quadro 1: Sequências de iniciadores utilizados no RT-PCR

INICIADORES	GENÓTIPO	SEQUÊNCIAS 5'- 3'	REFERÊNCIA
RVG9	Específica para todos os genótipos	GTCACACCATTGTAAATTCG	GOUVEA <i>et al.</i> , 1990
aBt1N	G1	CAAGTACTCAAATYATRGATGG	GOUVEA <i>et al.</i> , 1990
aCt2N	G2	CAATGATATTACTACATTTTCYRTG	GOUVEA <i>et al.</i> , 1990
aET3	G3	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	GOUVEA <i>et al.</i> , 1990
aDT4	G4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	GOUVEA <i>et al.</i> , 1990
aAT8n	G8	GTYACACAATTTGTAAATTCG	GOUVEA <i>et al.</i> , 1990
aFT9n	G9	CTAGTAGTRACTAYAAMTAC	GOUVEA <i>et al.</i> , 1990

Quadro 2 : Sequências de iniciadores para identificação de G (VP7) utilizados no PCR

INICIADORES	GENÓTIPO	SEQUÊNCIAS 5'- 3'	REFERÊNCIA
Con3	Específico para todos os genótipos	TGGCTTCGCTCATTTATAG ACA	GENTSCH <i>et al.</i> , 1992
1T-1-	P1A[8]	TCTACTTGGATAACGTGC	GENTSCH <i>et al.</i> , 1992
2T-1	P1B[4]	CTATTGTTAGAGGTTAGAG TC	GENTSCH <i>et al.</i> , 1992
3T-1	P2A[6]	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	GENTSCH <i>et al.</i> , 1992
4T-1	P3[9]	TGAGACATGCAATTGGAC	GENTSCH <i>et al.</i> , 1992
5T-1	P4[10]	ATCATAGTTAGTAGTCGG	GENTSCH <i>et al.</i> , 1992

Quadro 3: Sequências de iniciadores para identificação de P (VP4) utilizados no PCR

4.5.1 Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

O RNA viral foi, primeiramente, desnaturado a 97°C por 5 minutos, e foi adicionado ao tubo eppendorf contendo o Go Taq® Green Master Mix acrescido da enzima Transcriptase Reversa (Promega, USA), do inibidor de RNase (Promega, USA) e do par de iniciadores específicos para o segmento 9-VP7 (Beg9 e End9), ou do par de iniciadores para o segmento 4- VP4 (con3 e con2). O volume final da reação foi de 50µL e as amplificações foram realizadas no termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

A amplificação do segmento 9 foi realizada sob as condições descritas por Gouvea e colaboradores, 1990. Primeiramente, foi realizado ciclo de conversão do RNA em DNA a 42°C por 30 minutos, seguido de 94°C por 1 minuto. Após a reação de RT, iniciou-se a PCR com 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização a 42 °C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72 °C por 7 minutos e conservação a 4°C.

A amplificação do segmento 4 foi realizado segundo Gentsch e colaboradores, 1992. A reação de RT foi realizada a 42°C por 30 minutos, seguida de 94°C por 1 minuto. A PCR iniciou-se com 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, hibridização a 50°C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72°C por 7 minutos e conservação a 4 °C.

4.5.2 Nested- PCR

Para a reação do segundo PCR, o cDNA obtido no RT-PCR foi adicionado a uma solução contendo o Go Taq® Green Master Mix e os iniciadores genótipo-específico para genótipo G e P, que resultam na síntese de fragmentos com diferentes pesos moleculares, os quais correspondem a um genótipo distinto de RV.

O volume final da reação foi 50µL, e a amplificação foi realizada no GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

A identificação dos genótipos G foi realizada sob as condições descritas por Gouvea e colaboradores, 1990, com 15 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, hibridização a 50 °C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72 °C por 7 minutos e conservação a 4 °C.

A identificação dos sorotipos P foi realizada seguindo as condições de Gentsch e colaboradores, 1992, com 15 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, hibridização a 50 °C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72 °C por 7 minutos e conservação a 4 °C.

O produto do PCR foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose a 2%, a 100V por 45 minutos. Posteriormente o gel foi corado com Brometo de Etídeo, durante 15 minutos, e os fragmentos genômicos amplificados foram visualizados e fotografados no fotorevelador.

4.6 DETECÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CONTRA O RV

4.6.1 Produção do RV Bovino

O RV bovino foi produzido em monocamadas confluentes de cultivos de células de rim de macaco, denominadas MA-104.

Para a multiplicação das células de linhagem MA-104, foram utilizadas garrafas tipo Roux, mantendo as células em meio D-MEM (Meio Essencial Eagle) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Para o repique da cultura celular foi utilizada a técnica de desagregação enzimática com tripsina 0,25%.

Para a produção do RV bovino, o vírus foi primeiramente ativado com tripsina (20µg/ml) foi incubado por 30 minutos a 37°C. As garrafas contendo as células MA-104 foram lavados 3x com Meio D-MEM sem soro ou PBS 1x estéril para remoção do soro bovino. Posteriormente as células foram inoculadas com o sobrenadante contendo o vírus ativado, seguido de adsorção viral por 1 hora a 37 °C.

Após esse período, o inoculo foi retirado e foi adicionado meio D-MEM contendo tripsina 2 µg/ml, antifúngico e antibiótico, e os cultivos foram mantidos em estufa a 37 °C até a observação do efeito citopático (desprendimento da monocamada de células infectadas). Posteriormente, as garrafas foram submetidas a ciclos de congelamento (-20°C) e descongelamento, e o sobrenadante e as células foram coletados e armazenados até seu posterior uso.

4.6.2 Imunofluorescência Indireta

Para confirmar a presença viral foi realizada a técnica de Imunofluorescência Indireta nas culturas de MA-104 infectadas com o RV Bovino.

As células MA-104 foram cultivadas em tubos contendo lamínulas, e foram infectadas como RV bovino (Materiais e Método 5.6.1). Após a observação do efeito citopático, as lamínulas contendo as células infectadas foram fixadas em acetona a -20 °C, e incubadas com soro hiperimune de coelho por 1hora a 37°C. Após essa primeira incubação, as lamínulas foram lavadas 3 vezes em PBS por 10 minutos, e depois incubadas com anticorpo anti-coelho conjugado FITCH (isotiocionato de fluoresceína). As lamínulas foram lavadas novamente 3 vezes PBS por 10 minutos, e em seguida foram incubadas com azul de Evans por 3 minutos. Logo após, as lamínulas foram fixada em lâminas de vidro com glicerina, e analisadas em microscópio de Imunofluorescência.

4.6.3 Detecção da Resposta Imune

4.6.3.1 Amostragem

A presença da resposta imunológica IgG contra o RV bovino foi analisada em 50 soros de crianças com até 12 anos sem sintomatologia clínica de quadro de gastroenterite, que foram cedidos ao Laboratório de Virologia pelo Hospital Aliança.

4.6.3.2 Western Blot

As garrafas contendo as culturas infectadas foram submetidas a ciclos de congelamento (-20°C) e descongelamento, e o sobrenadante e as células foram coletados e centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos. Logo após, o pellet foi ressuspenso no tampão desnaturante de Laemmli, e levadas a 100°C por 3 minutos. Inicialmente as proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5%, por 2 horas a 100V, e em seguida, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, por 1 hora a 100V.

A verificação da eletrotransferência e identificação das proteínas foram realizadas através da coloração com a solução vermelho de *Ponceau* 0.5%. Uma vez confirmada a transferência, a membrana foi cortada em fitas, que foram identificadas, descoradas e bloqueadas por 1 hora sobre agitação em uma solução de 5% de leite desnatado diluídos em PBS (PBS-L-5%). Após o bloqueio, as fitas foram incubadas com soro dos pacientes 1:50 (v/v, PBS-L 0,5%) durante toda a noite. No dia seguinte, as fitas foram lavadas 3 vezes (por 10 minutos sobre agitação) com PBS mais 0.05% de tween (PBS-T, 0.05%), e foram incubadas por 1 hora a 37 °C com o anticorpo conjugado com peroxidase diluído 1:1000 (v/v, PBS-L 0,5%). Após a incubação, a membrana foi novamente lavada com PBS-T 0.05%. As bandas foram reveladas em uma contendo solução DAB (3'3 Diaminibenzidina-

SIGMA CHEMICAL CO) e 0.015% de peróxido de hidrogênio. A revelação foi interrompida com sucessivas lavagens em PBS, e as fitas foram secas e fotografadas.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise estatística foi utilizado o programa Epi-Info versão 6.4. e a plataforma online OpenEpi versão 2.3.1

5 RESULTADOS

5.1 PERFIL DA INFECÇÃO POR ROTAVÍRUS

No período de abril a julho de 2010, a análise de 90 amostras fecais de crianças através da técnica ELISA mostrou que 80 amostras foram positivas (89%) e 10 foram negativas (11%) (Figura 9).

A análise dos casos de gastroenterite por RV em crianças durante os meses avaliados (Figura 10) encontrou maior positividade no mês de junho com 43% (34/80) seguido do mês de julho com 25% (20/80).

A distribuição de gastroenterite associado RV em relação às diferentes faixas etária (Figura 11) encontrou maior frequência no grupo de crianças com até 2 anos de idade, que correspondeu 44% (35/80) das amostras positivas, e foi observado a diminuição no número de casos a partir dos 3 anos de idade.

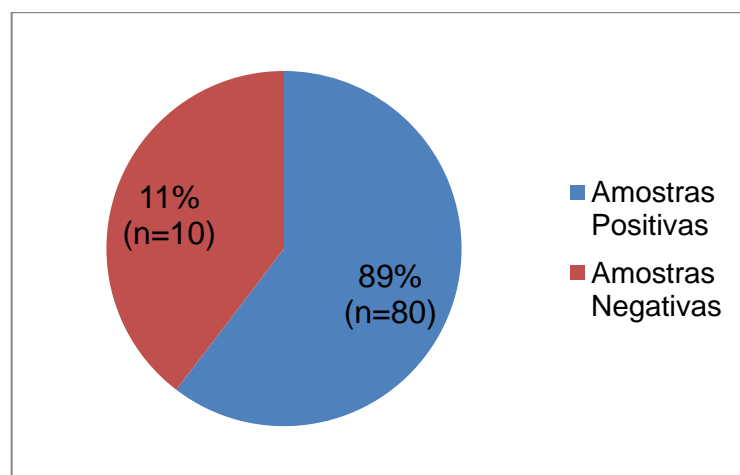


Figura 9: Detecção do RV através da técnica ELISA em amostras fecais de crianças hospitalizadas em Salvador no período de abril a julho de 2010

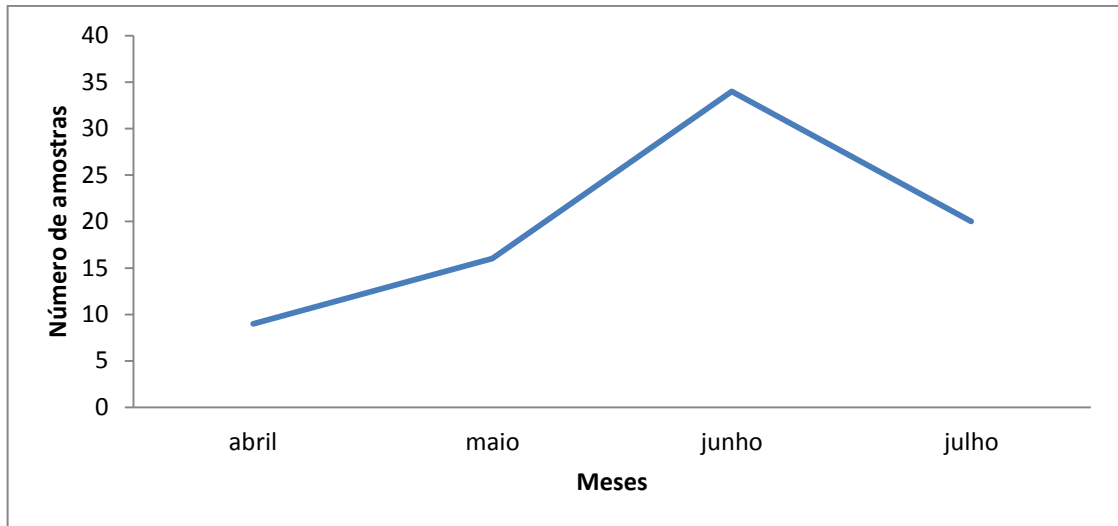


Figura 10: Distribuição de gastroenterite por RV durante o período analisado.

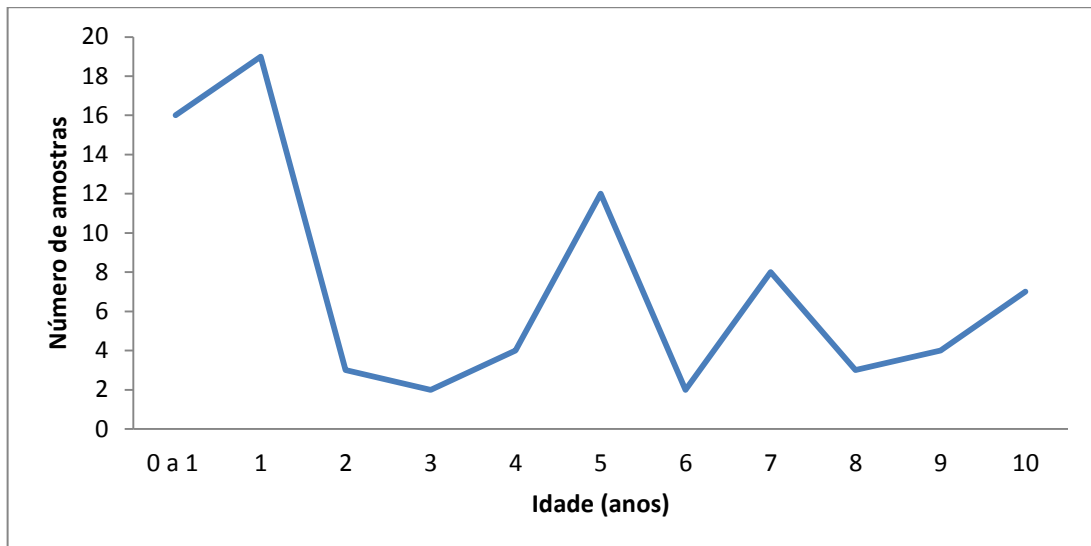


Figura 11: Distribuição de gastroenterite por Rotavírus em relação às diferentes faixas etárias.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DO ELETROFEROTIPO DE RV

Com base no perfil de migração dos segmentos de RNA genômico, todos os isolados analisados foram caracterizados como RV do grupo A associados ao eletroferotipo longo e obedeceram a distribuição dos segmentos de RNA viral na ordem 4:2:3:2 característicos desse vírus (Figura 12).

No total de 53 amostras analisadas pela técnica de SDS-PAGE, foi possível a visualização dos segmentos genômicos virais em 32 (60%) amostras positivas e em 21 amostras (40%) não foi observado o RNA viral.

Foi realizado a análise comparativa dos resultados das técnicas ELISA e SDS-PAGE, e observou-se que o SDS-PAGE em relação ao ELISA apresentou sensibilidade de 75% e especificidade de 50%, kappa 0.1319, valor preditivo positivo 93,75% e valor preditivo negativo 16,67% (Tabela 1).

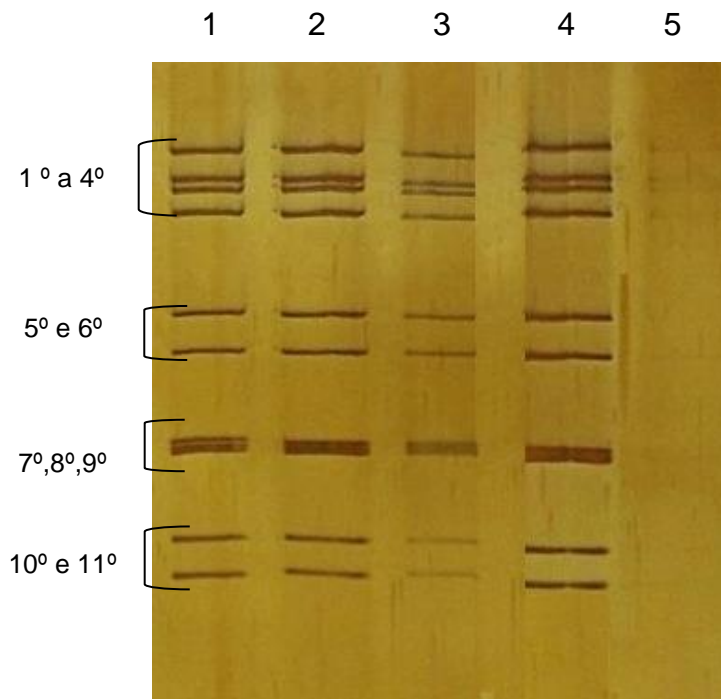


Figura 12: SDS-PAGE: Eletroforese do RNA genômico do Rotavírus em gel de poliacrilamida 7,5%. Colunas de 1 a 5, amostras positivas pela técnica de SDS PAGE. Linhas perfil de distribuição dos segmentos correspondentes ao grupo A (4:2: 3:2), perfil longo.

Tabela 1: Detecção do RV por ELISA e SDS-PAGE em amostras fecais de crianças hospitalizadas em Salvador no período de abril a julho de 2010.

		ELISA		
		Positivo	Negativo	Total
SDS-PAGE	Positivo	30 (56,6%)	2 (4%)	32 (60,4%)
	Negativo	19 (35,8%)	2 (4%)	21 (39,6%)
	Total	49 (92,4%)	4 (8%)	53 (100%)

5.3 GENOTIPIFICAÇÃO DOS RV ISOLADOS

A genotipagem do RV circulante foi realizada em 53 amostras positivas através da reação RT-PCR para a identificação dos genótipos G e P circulantes.

5.3.1 Genotipagem G

As amostras analisadas pela técnica de RT-PCR/ nested-PCR mostrou a identificação dos genótipos G em 21 (42%) amostras, sendo 9 (18%) classificadas como G1, 8 (16%) como G2, 2 (4 %) como G3 e 2 (4 %) como G9 (Tabela 2).

A figura 13 mostra os produtos de amplificação do gene 9 correspondente a proteína VP7 visualizados em gel de agarose 1%. Nessa figura são observados os produtos de 1062 pb amplificados no RT-PCR, e os produtos correspondentes aos genótipos G1 (749pb), G2 (652pb), G3 (374pb) e G9 (306pb).

Tabela 2 – Distribuição das frequências dos genótipos G detectados em amostras fecais de crianças hospitalizadas no período de abril a julho de 2010.

	Número de amostras	Frequência
G1	9	18%
G2	8	16%
G3	2	4%
G9	2	4%
Amostras negativas	29	58%
Total	50	100%

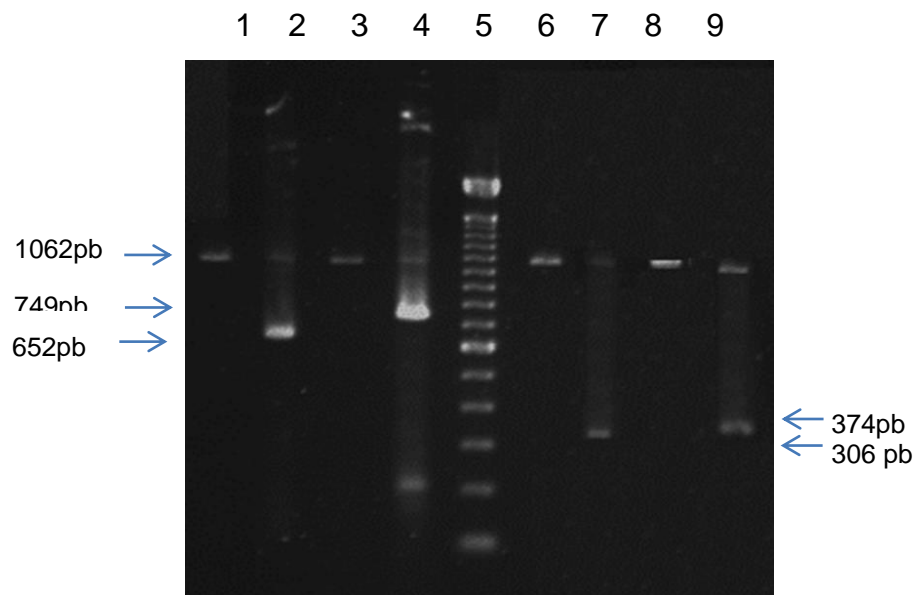


Figura 13: Genótipos G: Colunas 1, 3, 6 e 8, fragmentos de 1062pb correspondente a VP7. Colunas 2, 4, 7 e 9, os fragmentos correspondentes aos genótipos G2 (652pb), G1 (749pb), G9 (306pb) e G3 (374pb), respectivamente. Na coluna 5 o marcador de peso molecular de 100pb a 1500pb.

5.3.2 Genotipagem P

A genotipagem para P foi possível em 8 amostras, e dentre elas 5 (10%) amostras foram caracterizadas como P4 e 3 amostras corresponderam a P6 (tabela 3).

A figura 14 mostra os produtos de 876 pb amplificados pela RT-PCR visualizados em gel de agarose 1% e que correspondem ao segmento 4 que codifica a VP4. Nessa figura também é possível observar a amplificação dos produtos referentes à P4 e P6, 483 pb e 267 pb respectivamente.

Tabela 3- Distribuição das frequências dos genótipos P detectados em amostras fecais de crianças no período de abril a julho de 2010.

	Número de amostras	Frequência
P4	5	10%
P6	3	6 %
Amostras negativas	42	84%
Total	50	100%

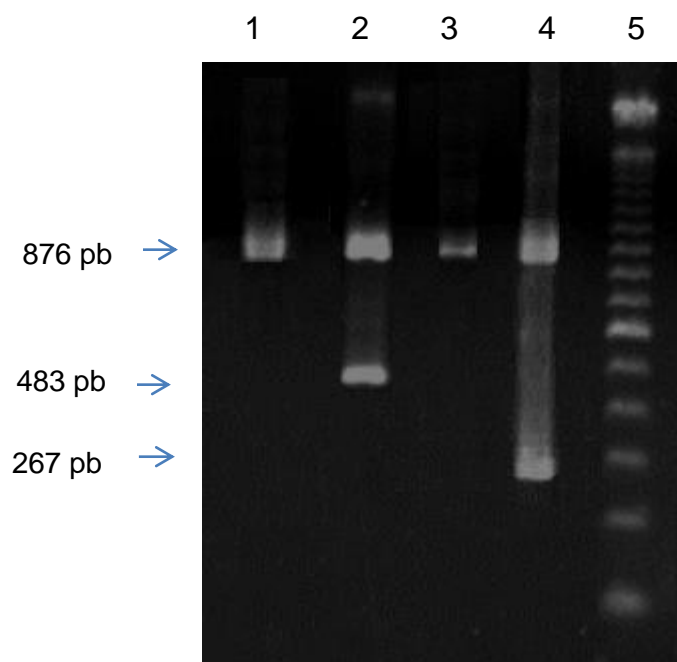


Figura 14: Genótipos P: Colunas 1 e 3- fragmentos de 879 pb correspondente a VP4. Coluna 2, o fragmentos de 483 pb correspondentes aos genótipos P4. Coluna 4 fragmento de 267 pb correspondente a P6. Na coluna 5, o marcador de peso molecular de 100pb a 1500pb.

5.3.3 Combinação dos genótipos P e G

Na tabela 4 estão identificados os genótipos G e P encontrados. Contudo, a combinação binária foi determinada em 8 (16%) das 50 amostras analisadas, sendo identificadas 2 amostras G1P[4], 2 amostras G1P[6], 1 amostra G2P[4], 1 amostras G2P[6] e 2 amostras G3P[4].

Tabela 4- Distribuição das frequências das combinações binárias dos genótipos G e P detectados em amostras fecais de crianças com no período de abril a julho de 2010.

Genótipo “G”	Genotipo “P”	Número de amostras	Frequencia
G1	P4	2	25%
G1	P6	2	25%
G2	P4	1	12,5%
G3	P4	2	25%
G2	P6	1	12,5%

5.4 DETECÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CONTRA RV

5.4.1 Produção Viral

A presença do RV bovino foi confirmado através da técnica de imunofluorescência indireta. Como pode ser observado na figura 15, a replicação viral é evidenciada pela produção de uma forte fluorescência citoplasmática. Notou-se também que algumas células apresentavam inclusões no citoplasma semelhante a viroplasmas, que é o local onde ocorre a replicação e montagem do vírus.

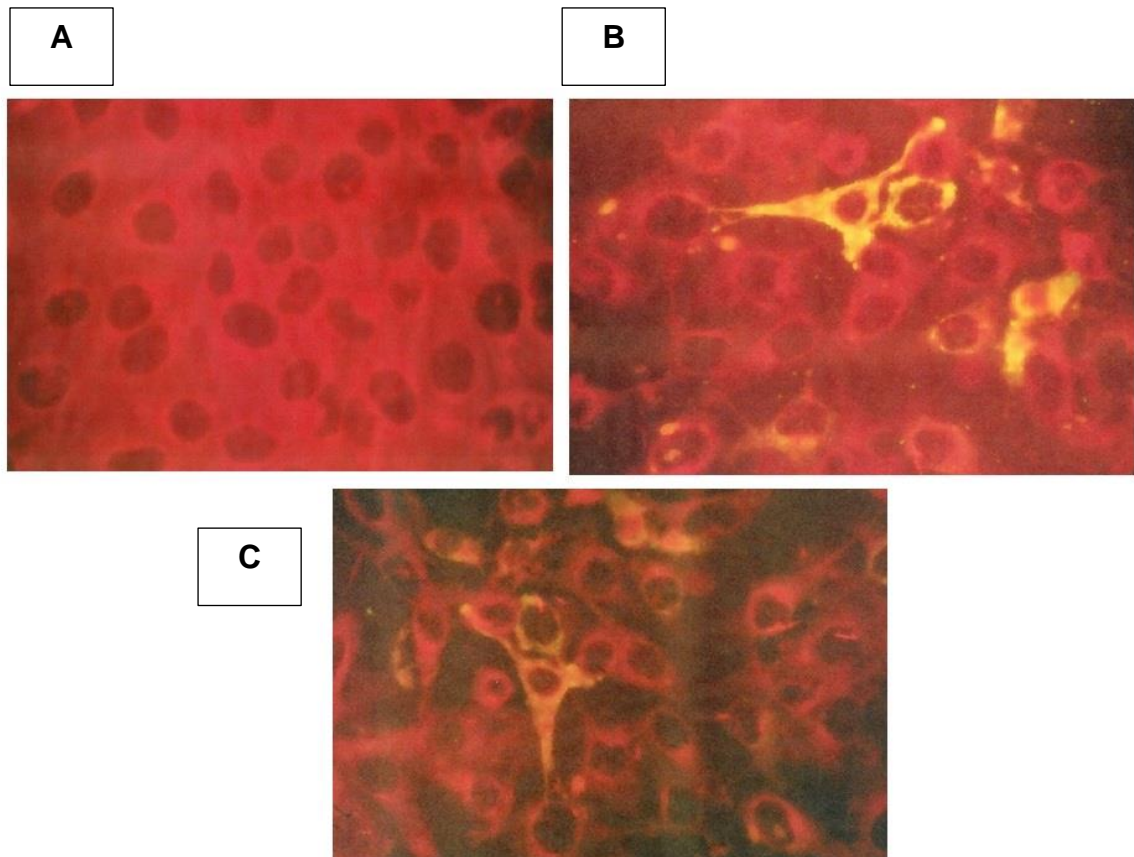


Figura 15: Imunofluorescência Indireta. (A) Células MA-104 não infectadas. (B) Células MA-104 infectadas com RV Bovino, observa-se forte fluorescência citoplasmática. (C) Células MA-104 infectadas com RV Bovino, observa-se presença de viroplasmatas

5.4.2 Western Blot.

Foram analisados a presença de IgG anti-rotavírus em 50 soros de crianças através da técnica de Western blot. Do total analisados, 21 (42%) soros apresentaram resposta imune positiva, e foram observada bandas correspondentes as proteínas VP6, VP7 e NSP4 (Figura 16). Em 29 (48%) soros não foi observado a reação imune contra as proteínas virais

A relação dos soros positivos com as faixas etárias do grupo estudado é demonstrada na tabela 5, e observa-se que 14 dos 21 (66%) soros positivos pertencem a crianças com até 5 anos, e 7 (34%) soros pertencem a crianças entre 6 e 11 anos.

Tabela 5- Distribuição das faixa etárias dos soros positivos no Western blot.

Grupos	Idade	Número de amostras	Frequência
<u>0 a 5 anos</u>	0 a 1 ano	4	19%
	2 anos	3	14%
	3 anos	2	9.5%
	4 anos	4	19%
	5 anos	1	5%
<u>6 a 11 anos</u>	6 anos	2	9.5%
	7 anos	2	9.5%
	8 anos	1	5%
	9 anos	0	0%
	10 anos	1	5%
	11 anos	1	5%

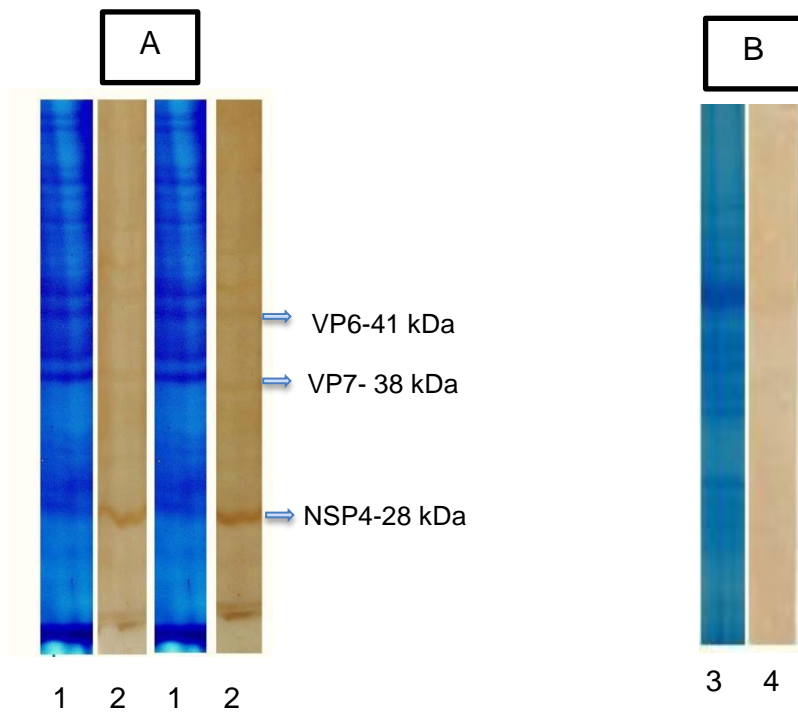


Figura 16: Identificação das proteínas do RV bovino por soros de crianças.
(A) Proteínas virais reconhecidas pelos soros de criança 1) SDS-PAGE das proteínas virais, 2): Western Blot dos soros número 1 e 2.
(B) Proteínas celulares não infectada-controle 3): SDS-PAGE das proteínas celulares. 4) Western Blot do soro número 1

6 DISCUSSÃO

O RV é um dos principais responsáveis pelos quadros de gastroenterite severa em crianças, e a identificação dos genótipos na população colabora com a monitorização do vírus circulante.

No presente trabalho, observou-se que RV foi o agente causal dos quadros de gastroenterites analisados, sendo encontrada no mês de junho maior frequência desta infecção. Contudo, o aumento dos casos de infecção por RV encontrado nesse trabalho pode estar relacionado com maior pluviosidade observado no referido período de 2010, que facilitou a permanência do vírus no ambiente, principalmente em recintos fechados com maior aglomerado de pessoas (escolas, creches, etc).

O estudo também mostrou que a faixa etária mais atingida foi o grupo de crianças menores de dois anos, com um menor índice de infecção a partir dos três anos. Esses dados coincidem com os descritos na literatura, onde alguns autores demonstram a maior prevalência da infecção por RV em crianças de até dois anos, e sugerem que a diminuição da prevalência acontece desde o terceiro ano de vida. Fato que estaria relacionado à imunidade adquirida pela a maioria das crianças, devido a infecções sintomáticas ou assintomáticas que surgem até os cinco anos de idade. (ANDREAS *et al.*, 2007; ANGEL *et al.*, 2007; CHANDARN *et al.*, 2010).

O diagnóstico da infecção por RV pode ser realizado pela técnica de ELISA que permite a identificação do vírus nas fezes de forma rápida e específica, e por isso é considerada uma importante ferramenta diagnóstica. A identificação do genoma viral pela metodologia de SDS-PAGE, apesar de ser importante para caracterização do grupo de RV responsável pela infecção, não é usada como diagnóstico, mas é amplamente utilizada em estudos epidemiológicos. Na comparação dos dados obtidos pelas duas técnicas aplicadas nesse estudo pode-se observar que o SDS-PAGE apresentou leve concordância com o ELISA, porém foi menos sensível. Esse fato pode ser explicado por uma possível degradação do RNA viral por enzimas

presentes nas fezes, que dificulta a detecção no SDS-PAGE. Mas apesar dos valores de sensibilidade e especificidade, o SDS-PAGE ainda é uma importante ferramenta para os estudos moleculares do RV, pois permite de forma rápida a identificação do eletroferotipo viral circulante. A análise do genoma viral através dessa técnica encontrou o eletroferotipo correspondente o grupo A em todas as amostras analisadas, o que confirma a predominância desse grupo nas infecções gastrointestinais causadas pelo RV em crianças. Campos e colaboradores (2002) e Serravalle e colaboradores (2007), também, identificaram o grupo A como o agente causal de gastroenterite em crianças nos anos de 1998 a 2002, dessa forma esses achados sugerem a circulação do grupo A até os dias atuais nesta população.

O estudo molecular do RV do grupo A mostrou a maior ocorrência de G1 e G2, seguido de G3 e G9. Esses resultados divergem com os descritos no primeiro estudo da caracterização molecular do RV em Salvador, que detectou a predominância de G9 seguido de G1 e G4 (SERRAVELLE *et al.*, 2007), e recentemente, Munford e colaboradores (2009) detectaram G9 e relataram pela primeira vez a presença de G2 nessa população. Dessa forma, observa-se que o perfil de circulação dos genótipos G responsáveis pela infecção por RV estaria em contínua modificação nessa comunidade. Estas variações observadas em várias partes do país levou a divisão da epidemiologia dos genótipos de RV no Brasil em dois períodos: o primeiro antes da introdução da vacinação (1982-2005) onde G1 foi o genótipo mais prevalente no país (PIETRUCHINSKI *et al.*, 2004; CARVALHO-COSTA *et al.*; 2006) e o segundo após a vacinação (a partir de 2006) onde foi observado a reemergência de G2, sendo apontado como o mais prevalente em diferentes regiões do país (GUNGEL *et al.* 2007; ARAUJO *et al.*, 2010; BOGES *et al.*, 2011; DULGHEROFF *et al.*, 2012). Alguns trabalhos realizados após 2006 sugerem que esse maior ocorrência de G2 poderia estar associado a uma menor eficácia da vacina contra esse genótipo. Porém estudos longitudinais e de corte com grupos de crianças vacinadas e não vacinadas contra RV que encontraram maior detecção de G2 nos dois grupos descartariam a influencia da vacina, mas sugerem que esse evento estaria associado a uma flutuação normal da circulação dos genótipos de RV (GURGEL *et al.*, 2007; CARVALHO-COSTA *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2011). Essa flutuação na circulação dos genótipos de RV foi observada por Bishop e colaboradores (1991) na Austrália, que descreveram a

reemergência de G2 a cada 10 anos. No Brasil, dados epidemiológicos também demonstram um intervalo de 10 anos entre a diminuição na detecção de G2 em 1996 e seu posterior ressurgimento em 2006 (OLIVEIRA & LINHARES, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Além disso, esse ressurgimento notável de G2 parece estar relacionado a um evento continental, pois países americanos como Argentina, Honduras, El Salvador, Guatemala, Paraguai também relatam a predominância de G2 nas infecções por RV a partir de 2006 (LEITE *et al.*, 2008).

A respeito da genotipagem de P (apesar da limitada detecção motivada possivelmente pela degradação do RNA genômico) foi possível a identificação de dois genótipos P4 e P6. No entanto, estudos moleculares do RV em Salvador mostram que P8 foi predominante nos casos de gastroenterites até 2006, sendo o P4 responsável por apenas 1,1% das infecções (SERRAVALLE *et al.*, 2007; MUNFORD *et al.*, 2009). Contudo, P4 e P8 são considerados os responsáveis por 90% das infecções por RV no mundo, sendo o P6 o segundo mais frequente. Alguns trabalhos identificaram semelhança entre o genótipo P6 humano e animal, e apontam para uma possível transmissão interespecies (PEREIRA, 2011). O estudo realizado por Mascarenhas e colaboradores (2010), com amostras de P6 isoladas de pacientes com gastroenterite em Belém, Pará, através da análise filogenética encontraram similaridade entre a cepa humana e suína, e reforçam a possibilidade de transmissão interespecie. Além disso, sugerem a contínua investigação desses fenômenos, pois pode constituir uma limitação para o desenvolvimento de novas vacinas. No entanto, as combinações dos genótipos G e P mostrou a circulação de cinco cepas diferentes, sendo elas G1P[4], G1P[6], G2P[4], G2P[6] e G3P[4]. Esses resultados divergem com os descritos anteriormente nos estudos moleculares de RV em Salvador, que indicavam a predominância de G9P[8], seguido de G1P[8] e G4P[8] até 2002, e após esse período G2P[4] seguido de G9P[8] e G9P[4] até 2006 (SERRAVALLE *et al.*, 2007; MUNFORD *et al.*, 2009). A mudança no perfil de detecção dos genótipos de RV pode estar relacionada com a introdução em 2006 da vacina monovalente composta da cepa humana atenuada G1[P8] (Rotarix®). A proteção oferecida para esse genótipo resultou na diminuição da sua incidência, mas em contrapartida essa vacina não ofereceria proteção efetiva contra outros genótipos. Após a introdução da vacinação, tal fenômeno foi observado com o genótipo G2[P4]. A proteção contra o G1P[8] e a flutuação normal dos genótipos de

RV resultou na maior detecção de G2P[4] no Brasil, e atualmente é apontado como o genótipo mais predominante nos casos de gastroenterite por RV no país (CARVALHO-COSTA, *et al.* 2009; BORGES *et al.*, 2011; IKEDA- CARMO *et al.*, 2011, VIEIRA *et al.*, 2011; DULGHEROFF, *et al.*, 2012).

Até o momento, as pesquisas moleculares do RV apontam a dinâmica de circulação desse vírus no mundo, e são fundamentais os programas de imunização, já que vacinas são desenvolvidas e introduzidas com base nos principais genótipos circulantes no país, como aconteceu no Brasil em 2006 que introduziu a vacina monovalente Rotarix®. Entretanto, estudos da resposta imunológica contra o RV na população não são realizados com frequência, e por isso, este trabalho abordou a resposta imune contra o RV em um grupo crianças.

A resposta imune protetora contra o RV pode ser adquirida através de infecção natural ou pela vacinação. Nesse estudo, observou-se que 40% das amostras testadas identificaram as bandas correspondentes as principais proteínas imunogênicas virais (VP6, VP7 e NSP4), e foi encontrado maior resposta imune em crianças com até cinco anos de idade. Esses dados colaboram com os descritos na literatura, que indicam maior prevalência da infecção por RV em crianças menores que cinco anos e consideram essa faixa etária como grupo de risco dados (PARASHAR, 2003), e demonstram que a população estudada apresentou alguma forma de contato com RV o qual resultou na resposta imune detectada. Contudo, novos estudos epidemiológicos dos vírus entéricos apontam para a diminuição da gastroenterite por RV após a introdução da vacina no Brasil, e sugerem o aumento das infecções por outros vírus, principalmente o Norovírus (NoV) (RIBEIRO *et al.*, 2008; CILLI *et al.*, 2011). Fato semelhante foi observado pelo Laboratório de Virologia em seus trabalhos com RV e NoV (dados ainda não publicados), e sugere que uma maior proteção contra o RV aumentaria a possibilidade de infecção por outros agentes virais responsáveis por quadro de gastroenterite.

Concluindo, os resultados descritos demonstram na cidade de Salvador a contínua circulação do RV do grupo A, com mudança do perfil de circulação dos genótipos RV para a atual predominância de G1, G2, P4 e P6, e uma população de crianças susceptível com capacidade de resposta imune para RV. Dessa forma, estudos

moleculares e sorológicos devem prosseguir ajudando elucidar questões como diversidade genética, história evolutiva e circulação desse vírus, contribuindo para novas políticas de vacinação e de monitorização dos genótipos de RV circulantes.

7 CONCLUSÃO

- A gastroenterite por RV apresentou alta frequência entre Abril de Julho de 2010.
- O RV do grupo A foi o predominante nos casos de gastroenterites detectados.
- As técnicas de SDS-PAGE e ELISA apresentaram leve concordância sendo consideradas ferramentas importantes para o estudo do RV.
- No ano de 2010 foi observada a mudança na circulação dos genótipos de RV em relação aos anos de 1998 a 2002 e 2005 a 2006.
- Os genótipos G1, G2, G3 e G4 foram detectados na população estudada, sendo observada a predominância de G1 e G2.
- Os genótipos P identificados nesse estudo foram P4 e P6.
- Em relação à combinação binária de G e P, foram detectados 5 genótipos : G1P[4], G1P[6], G2P[4], G2P[6] e G3P[4].
- A população estuda apresentou resposta imune protetora contra as proteínas imunogênicas do RV.

8 PERPESCTIVA

- Sequenciamento genético das amostras e estudo filogenético.
- Desenvolvimento de Kits nacionais para detecção do RV em amostras de fezes pelo método de ELISA Indireto.
- Desenvolvimento de Kits nacionais para a extração eficaz do RNA do RV em amostras de fezes.
- Desenvolvimento de Kits nacionais para genotipagem do RV, podendo ser utilizado nos laboratórios clínicos.
- Estudo e desenvolvimento de um banco de dados sobre o Rotavírus, o qual forneça informação de eletroferotipo, genótipos e os segmentos genômicos sequenciados.

REFERÊNCIAS

- AHMAH,G.E. *et al.* The Global Spread of Rotavirus G10 strains: Detection in Ghanaian Children hospitalized with Diarrhoea. **Journal of Infection Disease**, v.202, (Supl): S231–S238, 2010.
- ALFIERI,A. *et al.* Reoviridae.In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. 1 Ed. Porto Alegre. Editora UFSN,2007, p.780-752.
- ANGEL,J;FRANCO, M.A; GREENBERG, H.B. Rotavirus vaccines: recente developments and future c onsiderations. **Nature review- microbiology**, v. 5, p. 529-540, 2007.
- ARAÚJO, T.M.E *et al.* Outbreak of diarrhea by rotavirus in Bom Jesus city, Piauí State. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15,p.1039-1046, 2010.
- BISHOP,R.F; UNICOMB, L.E; BARNES, G.L. Epidemiology of rotavirus serotypes in Melbourne, Australia, from 1973 to 1989. **Journal of clinical microbiology**, v. 29, n.5, p. 862-868, 1991.
- BECK,P.A. *et al.* Characterization of monoclonal antibodies against bovine rotavirus and their diagnostic applications. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.3, p.551-557, 2007.
- BORGES, A.M.T. *et al.* Monitoring the circulation of rotavirus among children after the introduction of the rotarix™ vaccine in Goiânia, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n.4,p. 499-501, 2011.
- BRAGA, Carla Neves Laranjeira. **Caracterização dos genótipos G do Rotavírus grupo A circulantes no Distrito Federal**. 2007. 96f. Dissertação (Mestre em Ciência da Saúde). Faculdade de Ciência da Saúde, Universidade de Brasília, 2007.

BRICKS, L.F. Rotavírus: up to date about diseases and vaccines. **Pediatria**, v.27, n.4,p.252-266,2005.

CAMPOS, G.S. *et al.* Detection of human rotavirus in children with diarrhea episodes in Salvador, Bahia, Brazil. **Revista de Ciências Médicas e Biológica**, v. 1, n. 1, p. 7-11, 2002.

CARMONA, Rita de Cássia Compagnoli. **Diversidade Genética dos Rotavírus Humanos detectados em pacientes com diarreia aguda no Estado de São Paulo, no período de 1996 a 2006**. 2010.181f. Tese(Doutorado em Ciência). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2010.

CARVALHO-COSTA, F.A. *et al.* Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n.3,p 291-294, 2006.

CARVALHO-COSTA, F.A. *et al.* Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 95-97, 2009.

CARVALHO-COSTA, F.A. *et al.* Laboratory-based Rotavirus Surveillance During the Introduction of a Vaccination Program, Brazil, 2005–2009. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 30, n.1, 2011.

CHANDRAN, A. *et al.* Prevention of rotavirus gastroenteritis in infants and children: rotavirus vaccine safety, efficacy, and potential impact of vaccines. **Biologics: Targets & Therapy**, v.4, p.213–229, 2010.

CILLI, A. *et al.* Characterization of rotavirus and norovirus strains: a 6-year study (2004-2009). **Jornal de Pediatria**,v.87, n.5,p.445-9, 2011.

COSTA, P.S.S. *et al.* Clinical and epidemiological trends in Rotavirus A infections.**Pediatria**, v.26, n.3, p.151-158,2004.

COSTA,P.S.S. *et al.* Clinical and epidemiological trends in Rotavirus A infections in pediatric patients, state of Espírito Santo. **Memoria do Instituto do Oswaldo Cruz**, v.103,n.2, p. 201-206, 2008.

DENNEHY, P.H. Rotavirus Infection:An Update on Management and Prevention. **Advances in Pediatrics**, v.59,p. 47–74,2012.

DULGHEROFF, A.A.*et al.* Distribution of rotavirus genotypes after vaccine introduction in the TriânguloMineiro region of Brazil: 4-Year follow-up study. **Journal of Clinical Virology**, v.55, p. 67– 71, 2012.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.. **Fields Virology**. 3 Ed. New York: Raven Press, 1996. p.1625-55.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B. N KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 4 Ed. Philadelphia: Lippincott Willians & Wilkins, 2001. p.1747-85.

ESTES, M. K.& KAPIKIAN,A.Z Rotaviruses. In: FIELDS, B. N KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5 Ed. Philadelphia: Lippincott Willians & Wilkins, 2007.p.1917-1957.

FERREIRA, Talita Lopes. **Avaliação da ação neutralizante de anticorpo IgA e IgG anti-rotavírus SA11 em soro de adultos saudáveis**. 2011.60f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia). Instituto Butantan, São Paulo, 2011.

GLADSTONE,B.P. *et al.* Protective Effect of Natural Rotavirus Infection in an Indian Birth Cohort. **The new england journal of medicine**, v.46 p.365:33, 2011.

GENTSCH,J.R.*et al.* Identification of Group A Rotavirus Gene 4 Types by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 1365-1373,1992.

GOUVEA, V. *et al.* Polymerase Chain Reaction Amplification and Typing of Rotavirus Nucleic Acid from Stool Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28,n.2, p.276-282. 1990

GOUVEA, V. & SANTOS,N. Molecular epidemiology of rotavirus in Brazil: A model for the tropics. **Virus reviews & research**,

GOUVEA, V.& BRANTLY M. Is rotavirus a population of reassortants? **Trends in Microbiology**, v. 3, n.4, p. 159-162,1995.

GOUVEA, V. & SANTOS,N.Infecções por Rotavirus: Aspectos Atuais.**Jornal Brasileiro de Patologia**, v.3, n.2, 1997.

IKEDA-CARMO, G.M. *et al.* Decline in Diarrhea Mortality and Admissions after Routine Childhood Rotavirus Immunization in Brazil: A Time-Series Analysis.**PLOS Medicine**, v.8, n.4,2011.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Acessado em 15 de janeiro de 2013.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. Informes Técnicos Institucionais: Diarrhea and rotavirus. **Revista de Saúde Pública**, v.38, n.6,p.844-845,2004.

KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: FIELD, B. N. *et al.* (Eds.). **Virology**. 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p.1657-708.

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

LEITE, J.P.G, CARVALHO-COSTA, F.A, LINHARES, A.C. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience -A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, V.103, N.8, p. 745-753, 2008.

LICIA L.L. MOREIRA,L.L.L;NETTO, E.M; NASCIMENTO-CARVALHO,C.M. Risk factors for nosocomial rotavirus infection in a paediatric hospital: The potential role for rotavirus vaccine use. **Vaccine**, V.27, p.416–420,2009.

LINHARES, A. C. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. **Cad Saude Publica**, v.16, p.629-46, 2000.

LINHARES,A.C. *et al.* Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. **Reviews in Medical Virology**,; v.21,p. 89–109, 2011.

MALIK, J; BRAN, M.K; RAY,P. Natural immunity to Rotavirus infection in children. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**,v.45, p.219-228,2008.

MASCARENHAS, J.D.P. *et al.* Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belém, Brazil. **Virus Research**, v.126, p. 149–158, 2007.

MATTHIJNSSENS, J. *et al.* Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human wa-like and porcine rotavirus strains and Human DS-1-Like and Bovine Rotavirus Strains. **Journal Of Virology**, v. 82, n.7, p. 3204–3219, 2008.

MATTHIJNSSENS, J. *et al.* Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Archive of Virology**, v.156, p.1397–1413, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Informe Técnico: Doença Diarréica por Rotavírus: Vigilância Epidemiológica e Prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus Humano - VORH** . Brasília, 18 de novembro de 2005.

MUKHERJEE, A. & CHAWLA-SARKAR, M. Rotavirus Infection: A perspective on epidemiology, genomic diversity and vaccine strategies. **Indian Journal of Virology**, v.22, n.1, p.11–23, 2011.

MUNFORD, V. *et al.* Rotavirus Gastroenteritis in Children in 4 Regions in Brazil: A Hospital-Based Surveillance Study. **The Journal of Infectious Diseases**,; v.200, p.106–113,2009.

OLIVEIRA, A.S.L & LINHARES, A.C. Molecular epidemiology of rotavirus G2 infection over a 16- year period (1992-2008) in the Amazon Region of Brazil. **Revista Pan-Amazonica de Saude**, v.2, n.1,p.95, 2011.

OLIVEIRA, D.F JOSÉ; MELO, J.H.L; SIMONETTI, A.C. Rotavirus and its epidemiology in diarrhoeal infections. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n.3, p.169-174, 2011.

OLIVEIRA, Robson Bruniera. **Avaliação da vigilância epidemiológica ampliada do rotavírus no Brasil**. 2011. 113f.Dissertação(Saúde Pública). Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca-ENSP/FIOCRU, Rio de Janeiro, 2011.

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

PARASHAR, U.D. *et al.* Rotavirus and severe childhood diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12,n. 2,p. 304-306, 2006.

PARASHAR, U.D. *et al.* Global Mortality Associated with Rotavirus Disease among Children in 2004. **The Journal of Infectious Diseases**, v.200, p.9–15,2009.

PEREIRA, Luciane Aparecida. **Variabilidade genética dos rotavírus do grupo a detectados em crianças com infecções gastrointestinais no hospital de clínicas da UFPR no período de 2001 a 2008**. 2011.130f. Dissertação. Pós-Graduação em Medicina Interna, área de concentração em Doenças Infecciosas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2011

PIETRUCHINSKI, Eduardo. **Detecção e caracterização molecular do Rotavírus Humano na cidade de Ponta grossa, Paraná**. 2004. 76. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Estadual de Londrina,2004.

PITZER, V.E. *et al.* Demographic Variability, Vaccination, and the Spatiotemporal Dynamics of Rotavirus Epidemics. **Science**, v. 325, p. 290, 2009.

PITZER, V.E. *et al.* Influence of birth rates and transmission rates on the global seasonality of rotavirus incidence. **Journal of the Royal Society. Interface**, v. 8, p.1584–1593, 2011.

RAY, P. & KELKAR, S.D. Measurement of Antirotavirus IgM/IgA/IgG Responses in the Serum Samples of Indian Children Following Rotavirus Diarrhoea and Their Mothers. **Journal of Medical Virology**, v.72, p.416–423,2004.

RIBEIRO, L.R. *et al.* Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.2, p. 201-206, 2008

RUIZ M. C; COHEN J;MICHELANGELI,F. Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. **Cell Calcium**, v.28,n.3,p. 137–149, 2000.

SAIK, Katene Werneck. **Genótipos do Rotavírus do grupo A em crianças com diarreia aguda atendidas em dois hospitais do município de Vitória- ES, em períodos anterior a imunização para o Rotavírus**. 2007. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Saúde).Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo,2007.

SALVADOR, P.T.C.O. *et al.* The rotavirus disease and the oral human rotavirus vaccination in the Brazilian scenario: an integrative literature review. **Ciência & Saúde Coletiva**,v.16, n.2, p. 567-574, 2011.

SANTOS, J.S. *et al.* Molecular Epidemiology of the Human Group A Rotavirus in the Paraná State, Brazil. **Brazilian archives of Biology and technology**, v.51, n. 2,p.287-294, 2008.

SANTOS, N. & HOSHINO, Y. Global distribution of rotavirus serotypes/ genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine **Reviews in medical virology**, v.15, p. 29–56, 2005.

SANTOS, N. *et al.* 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. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 8, p 4064–4069, 2005.

SARTORI, A.M.C. Rotavirus morbidity and mortality in children in Brazil. **Revista Panamericana de Saude Publica**, v. 23, n.2, 2008.]

SECRETÁRIA DE VIGILANCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: investigação de surto de gastroenterite em Salvador-Ba**. Brasília 2007.

SERRAVALLE, Karina. **Caracterização do genótipos de rotavirus isolados de crianças hospitalizadas com quadro diarreicos em Salvador, Bahia**. 2004.94f. Dissertação (Mestre em Imunologia). Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 2004.

SERRAVALLE, K. *et al.* Molecular Characterization of Group A Rotavirus Isolates Obtained from Hospitalized Children in Salvador, Bahia, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.11, n.1, p.35-39, 2007.

SOARES, L.S. *et al.* Molecular characterization of G1 human rotaviruses detected in children from Belém, Pará, Brazil. **Revista Pan-Amazonica-Saude**, v.1, n.1, p.125-130, 2010.

SURENDRAN, S. Rotavirus infection: molecular changes and pathophysiology. **EXCLI Journal**, v.7, p.154-162, 2008.

VELÁZQUEZ, R.F. *et al.* Serum Antibody as a Marker of Protection against Natural Rotavirus Infection and Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v.182, p.1602, 2000.

VIEIRA, S.C.F. *et al.* Acute diarrhoea in a community cohort of children who received an oral rotavirus vaccine in Northeast Brazil. **Memoria do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n.3, p. 330-334, 2011.

WEISBERG S.S. Rotavírus. **Dis Mon**, v.53, p.510-514, 2007.

WESTERMAN, L.E. *et al.* Serum IgG mediates mucosal immunity against rotavirus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102,n.20 ,2005.

WIDDOWSON,M. *et al.* Rotavirus disease and its prevention. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.21,p.26–31,2005.

ZANG, M. *et al.* A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from Rotavírus-