

**Universidade de Brasília**  
**Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Caracterização de genótipos G de rotavírus do grupo A  
circulantes no Distrito Federal.**

Karla Neves Laranjeira Braga

Brasília  
2006

**Universidade de Brasília**  
**Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Caracterização de genótipo G de rotavírus do grupo A circulantes  
no Distrito Federal.**

Karla Neves Laranjeira Braga

Orientadora: Cláudia Renata Fernandes Martins

Co-orientador: José Marcus Sócrates Teixeira

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde  
da Universidade de Brasília, como requisito parcial  
à obtenção o grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Brasília

2006

**Universidade de Brasília**  
**Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Caracterização de genótipo G de rotavírus do grupo A  
circulantes no Distrito Federal.**

Banca examinadora

Prof<sup>ª</sup> Dra. Cláudia Renata Fernandes Martins – Universidade de Brasília

Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite – Fundação Oswaldo Cruz

Prof<sup>ª</sup> Dra. Loreny Gimenes Giugliano – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido – Universidade de Brasília (suplente)

Brasília

2006

“É verdade que não podemos encontrar a pedra filosofal, mas é bom que ela seja procurada; procurando-a, descobrem-se muitos bons segredos que se não procuravam”.

*Bernard Fontenelle*

Aos meus pais, que me propiciaram tudo ao longo da vida e que são o meu alicerce e motivação para a realização de todos os meus projetos de vida, meu maior agradecimento pelo amor incondicional, pelo apoio e compreensão no decorrer desta empreitada.

Ao meu amigo e grande incentivador, Marcão, que me transmitiu conhecimentos valiosos, contribuindo extraordinariamente para uma primeira reflexão sobre o tema aqui tratado, dirijo um agradecimento especial pela generosidade, pela prontidão e interesse demonstrado. Agradeço, principalmente, pela confiança depositada no meu trabalho de dissertação.

## Agradecimentos

Á **Profª Cláudia Renata Fernandes Martins**, pela orientação precisa e pelo incentivo valioso, que me proporcionaram crescimento pessoal e profissional.

Ao amigo exemplar e mentor **José Marcus Sócrates Teixeira**, pelo respeito, dedicação, pela contribuição inestimável para a elaboração deste trabalho e, especialmente, por acreditar no meu sucesso.

Ao **Prof. José Paulo G. Leite** e à **Profª Loreny G. Giugliano**, membros da banca examinadora, pelas valiosas e oportunas considerações na análise deste trabalho.

À **Profª Divina Cardoso**, que gentilmente me recebeu em seu laboratório e disponibilizou tempo e material imprescindível à pesquisa, viabilizando a execução do meu treinamento na metodologia aplicada neste trabalho.

À amiga **Lídia Maria Pinto de Lima**, grande incentivadora deste trabalho, pela presteza, pelo carinho e pelo convívio agradável.

À **Marlene**, amiga de longa data, pelas valiosas observações e constante incentivo em várias etapas da minha vida.

Às amigas **Lícia, Luciana, Diana e Franciele**, que me ofereceram apoio, amizade e motivação em todos os momentos que compartilhamos no Lacen-DF.

À toda equipe do Núcleo de Virologia (Lacen-DF), em especial à **Heloisa, Fátima, Miriam, Sandra, Graziela, Chaib e Jorge**, por me receberem de forma tão acolhedora, e pelo constante incentivo.

Aos amigos, **Claudiner Oliveira, Daniela Cerqueira, Daniella Moraes, Eduardo Ramalho, Margareti Medeiros, Nazle Vêras, Patrícia Wyant, Regina Amorim, Tainá Raiol e Verônica Veras** do grupo de pesquisa em virologia da Universidade de Brasília, pela importante colaboração em várias etapas da execução deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria da Pós-graduação em Ciências da Saúde, em especial à **Grace**, pela atenção e gentileza com que sempre me atendeu.

Finalmente, aos meus pais e irmãos, por todo afeto, pela compreensão e apoio incondicional.

## Sumário

**Resumo, 9**

**Abstract, 10**

**Listas de Figuras, 11**

**Lista de Tabelas, 12**

**Lista de Gráficos, 13**

**Lista de Quadros, 13**

**Lista de siglas e de abreviaturas, 14**

### **1. Revisão Bibliográfica, 15**

- 1.1. Contextualização, 15
- 1.2. Aspectos históricos das infecções causadas por rotavírus, 17
- 1.3. Classificação dos rotavírus, 19
- 1.4. Estrutura das partículas virais, 23
- 1.5. Proteínas virais, 27
- 1.6. Replicação, 30
- 1.7. Transmissão e patogênese das infecções por rotavírus, 33
- 1.8. Métodos de detecção dos rotavírus, 35
- 1.9. Epidemiologia, 36
- 1.10. Vacinas contra rotavírus, 41

### **2. Objetivos, 45**

### **3. Metodologia, 46**

- 3.1. Amostragem, 46
- 3.2. Preparo das suspensões fecais, 47
- 3.3. Ensaio imunoenzimático combinado para Rotavírus e Adenovírus (EIARA), 47
- 3.4. Extração de RNA viral, 48
- 3.5. Análise por eletroforese em gel de Poliacrilamida (PAGE), 49
- 3.6. Reação em cadeia de Polimerase (PCR), 49
- 3.7. Eletroforese, 50
- 3.8. Precipitação, 51

- 3.9. Seqüenciamento automático, 51
- 3.10. Sorotipagem para a proteína VP7 (G), 51
- 3.11. Genotipagem G, 52
  - 3.11.1. Análise de homologia, 52
  - 3.11.2. Análise filogenética, 52
- 3.12. Análise estatística, 53

#### **4. Resultados, 54**

- 4.1. Amostragem, 54
- 4.2. Sazonalidade, 55
- 4.3. Detecção viral, 56
  - 4.3.1. Técnica de EIARA, 56
  - 4.3.2. Técnica de PAGE, 57
  - 4.3.3. Transcrição Reversa e reação em cadeia da Polimerase (PCR), 59
- 4.4. Genotipagem G, 60
- 4.5. Sorotipagem para a proteína VP7 (G), 65
- 4.6. Comparação entre Genótipos G e o Perfil eletroforético, 66
- 4.7. Análise Filogenética, 68

#### **5. Discussão, 70**

- 5.1. Sazonalidade, 71
- 5.2. Métodos de detecção dos rotavírus, 73
- 5.3. Genotipagem G, 74

#### **6. Conclusões, 80**

#### **7. Perspectivas, 82**

#### **8. Referências Bibliográficas, 83**



## Resumo

Os rotavírus são caracterizados por uma ampla diversidade genética, que possui implicações na epidemiologia das diarreias agudas infecciosas. O objetivo deste estudo foi descrever a variabilidade dos genótipos G dos rotavírus do grupo A circulantes no Distrito Federal, região Central do Brasil, nos períodos de 1986 a 1990; de 1994 a 1996 e de 2004 a 2005. Foram analisadas cento e três amostras fecais cedidas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal. Essas amostras foram coletadas em três períodos distintos: 1986 a 1990, 1994 a 1996, e de 2004 a 2005. A detecção dos rotavírus foi inicialmente realizada por meio das técnicas de EIARA (Ensaio Imunoenzimático para Rotavírus e Adenovírus) e PAGE (Eletroforese em Gel de Policriamida). Os resultados obtidos pelas duas técnicas apresentaram concordância de 98%. Apenas duas amostras foram positivas em PAGE e não reagentes no EIARA. Todas as amostras apresentaram perfil característico dos rotavírus do grupo A em PAGE. Das 103 amostras analisadas, 94 apresentaram perfil longo, oito perfil curto e um perfil curto atípico. Os RNAs foram transcritos reversamente e amplificados pela PCR, utilizando-se os primers 9con1 e 9con2, para a obtenção de um fragmento de 904 pb, correspondente ao gene que codifica a proteína VP7. Os produtos da PCR foram submetidos ao sequenciamento automático e as sequências obtidas analisadas pelos programas FASTA e BLAST. Quando os dados dos três períodos foram analisados conjuntamente, o genótipo predominante foi o G1 (50,48%), seguido pelos genótipos G9 (18,45%), G2 (10,68%), G5 (10,68%), G3 (5,83%) e G4 (3,88%). No primeiro período (1986-1990) 41% das amostras eram do genótipo G1; 24% do genótipo G5; 18% do genótipo G3 e 9% dos genótipos G2 e G4. No segundo período (1994-1996), 74,47% foram do genótipo G1; 17,02% G2; 6,38% G5 e 2,13% G4. No terceiro período (2004-2005) o genótipo mais prevalente foi o G9 (86,36%), seguido do G1 em 13,64% das amostras. A análise filogenética foi realizada pelo método de *neighbor-joining* e a separação dos ramos em genótipos apresentou valores de *bootstrap* elevados, confirmando os dados de homologia obtidos por meio dos programas FASTA e BLAST. As informações geradas por este trabalho estão de acordo com os dados da literatura e poderão subsidiar estudos futuros de eficácia da vacina que foi introduzida no Calendário Nacional de Imunização no Brasil, bem como o monitoramento dos genótipos de rotavírus circulantes no Distrito Federal e Entorno.

## **Abstract**

Rotaviruses are characterized by a high genetic diversity. Such diversity has potential implication on the epidemiology of acute infectious diarrhea. This work aimed to describe the variability of G genotypes from group A rotaviruses circulating in the Federal District, Central Brazil. One hundred and three fecal samples kindly provided by the Public Health Laboratory of the Federal District were analyzed. The samples were collected at three distinct timeframes: 1986 to 1990, 1994 to 1996 and 2004 to 2005. The rotavirus detection was initially performed by EIARA and PAGE. The results from these two procedures presented 98% of agreement. Only two samples were positive by PAGE and non reactive by EIARA. All samples showed electrophoretic profile compatible with group A rotaviruses. From the 103 samples analyzed, 94 showed long electropherotype, whereas eight showed short and one atypical electropherotype. The extracted RNAs were reversely transcribed and amplified by PCR, using 9con1 and 9con2 primers, generating DNA fragments with approximately 904 bp corresponding to part of the VP7 protein gene. The PCR products were submitted to automated sequencing and the generated sequences were analyzed by the FASTA and BLAST programs. When the three seasons were evaluated, the predominant genotype was G1 (50.48%), followed by G9 (18.45%), G2 (10.68%), G5 (10.68%), G3 (5.83%) and G4 (3.88%) genotypes. In the first season (1986-1990), 41.18% of the samples were described as genotype G1; 23.53% genotype G5; 17.65 G3 and 8.82% G2 and G4. During the second season (1994-1996), 74.47% of the samples were characterized as G1; 17.02% G2; 6.38% G5 and 2.13% G4. The most prevalent genotype of the third season (2004-2005) was G9 (86.36%) followed by G1 (13.64%). Phylogenetic analysis was performed by the neighbor-joining method and the segregation of the genotypes confirmed the homology results obtained by FASTA and BLAST. The information generated by this study is in agreement with the literature and may subsidize future evaluation of vaccine efficacy as well as the monitoring of rotavirus genotypes in the Federal District and in Brazil.

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Partículas de rotavírus visualizadas por imunomicroscopia eletrônica a partir de filtrados de fezes de crianças com gastroenterites agudas, 20
- Figura 2.** Principais características da estrutura de genoma dos rotavírus, 23
- Figura 3.** Ilustração das três camadas protéicas concêntricas que compõem as partículas virais dos rotavírus, 25
- Figura 4.** Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando cada um dos 11 segmentos de RNA de fita dupla e as proteínas codificadas pelo genoma dos rotavírus, 26
- Figura 5.** Representação esquemática do ciclo de replicação dos rotavírus no citoplasma de uma célula infectada, 32
- Figura 6.** Distribuição anual dos casos fatais de diarreia por rotavírus no mundo, 36
- Figura 7.** Distribuição mundial dos genótipos G e P de rotavírus humanos do grupo A entre crianças a partir de trabalhos publicados entre 1989 e 2004, 37
- Figura 8.** Distribuição dos genótipos G nos vários continentes a partir de dados coletados entre 1973 e 2003, 39
- Figura 9.** Distribuição dos genótipos P nos vários continentes a partir de dados coletados entre 1982 e 2003, 40
- Figura 10.** Eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata, evidenciando diferentes perfis eletroforético, 58
- Figura 11.** Análise eletroforética dos produtos de PCR em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, 60
- Figura 12.** Análise filogenética, realizada pelo método de *neighbor-joining*, das seqüências nucleotídicas de VP7, comparadas as seqüências de referência do rotavírus, 69

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1.** Distribuição do número total de casos positivos para rotavírus nos períodos de 1986 a 1990 e 1994 a 1996 segundo a faixa etária, 54

**Tabela 2.** Distribuição dos casos positivos para rotavírus A, segundo as estações do ano no Distrito Federal, 56

**Tabela 3.** Frequência dos perfis eletroforéticos por período estudado, 59

**Tabela 4.** Frequência dos diferentes genótipos G encontrados nos três períodos estudados, 64

**Tabela 5.** Distribuição dos genótipos G por ano em cada período analisado, 64

**Tabela 6.** Frequências dos genótipos G, sorotipos G e perfis eletroforéticos das amostras do segundo período, 66

**Tabela 7.** Perfis eletroforéticos e genótipos G detectados nas amostras do primeiro período, 67

**Tabela 8.** Perfis eletroforéticos e genótipos G detectados nas amostras do segundo período, 67

**Tabela 9.** Perfis eletroforéticos e genótipos G detectados nas amostras do terceiro período, 68

## **Lista de Gráficos**

**Gráfico 1.** Distribuição mensal das amostras positivas para rotavírus durante os três períodos estudados, 55

**Gráfico 2.** Frequências dos genótipos G encontrados nos três períodos estudados no Distrito Federal, 61

**Gráfico 3.** Genótipos G de rotavírus A detectados no Distrito Federal nos períodos de 1986 a 1990; 1994 a 1996 e 2004 a 2005, 62

**Gráfico 4.** Frequências dos genótipos G encontrados no três períodos analisados, 63

## **Lista de Quadros**

**Quadro 1.** Proteínas codificadas por cada um dos segmentos genômicos dos rotavírus e suas respectivas funções, 29

**Quadro 2.** Sequências e posições do alinhamento dos iniciadores consensuais utilizados, 50

## Lista de Siglas e Abreviaturas

<b>anti IgG:</b> anti-Imunoglobulina G	<b>Lacen-DF:</b> Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal;
<b>Anvisa-</b> Agência Nacional de Vigilância Sanitária	<b>MDDA -</b> Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas
<b>BLAST:</b> <i>Basic local alignment Search Tool</i>	<b>MED:</b> microscopia eletrônica direta
<b>CDC:</b> <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>	<b>mRNAs:</b> RNA mensageiro
<b>cDNA:</b> DNA complementar	<b>NJ:</b> <i>neighbor-joining</i>
<b>CNPq:</b> Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	<b>NSP:</b> <i>Non Structural Protein</i>
<b>DLPs:</b> <i>double-layered particles</i>	<b>PAGE:</b> Eletroforese em Gel de Policríamida
<b>DMSO:</b> dimetilsulfóxido	<b>PBS:</b> <i>Phosphate Buffer Solution</i>
<b>DNA:</b> ácido dextribonucléico	<b>PCR:</b> Reação em Cadeia pela Polimerase
<b>DO:</b> densidade óptica	<b>RNA:</b> Ácido Ribonucléico
<b>dsRNA:</b> ácido ribonucléico de fita dupla	<b>RV-A:</b> Rotavirus A
<b>EIA:</b> Ensaio Imunoenzimático	<b>SA-11:</b> <i>Simian rotavirus strain</i>
<b>EIARA:</b> Ensaio Imunoenzimático para Rotavirus e Adenovírus	<b>TLPs:</b> <i>triple-layered particles</i>
<b>ELISA:</b> <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	<b>VP:</b> <i>viral protein</i>
<b>EMBRAPA:</b> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	
<b>Epi Info:</b> <i>Epidemiology Information;</i>	
<b>Estatcalc Epi-6:</b> <i>Módulo Estatistic Calculator</i> do programa <i>Epi Info-6</i>	
<b>EUA:</b> Estados Unidos da América	
<b>FAPDF:</b> Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal	
<b>FINEP:</b> Financiadora de Estudos e Projetos	
<b>Fiocruz:</b> Fundação Oswaldo Cruz	
<b>IME:</b> imunomicroscopia eletrônica	

## 1. Revisão Bibliográfica

### 1.1. Contextualização

A diarreia aguda infecciosa é considerada uma causa importante de morbidade e mortalidade em crianças com menos de cinco anos de idade nos países em desenvolvimento, ocasionando elevada morbidade também em populações da mesma faixa etária em países desenvolvidos (Santos e Hoshino, 2005).

Os agentes etiológicos mais comumente associados às diarreias agudas em crianças são de natureza viral e bacteriana (Linhares *et al.*, 1983). As diarreias agudas bacterianas têm como agentes etiológicos mais frequentes a *Escherichia coli*, e com menor incidência o *Vibrio cholerae*, a *Salmonella sp.* e a *Shigella sp.* (Black *et al.*, 1980; Gomes *et al.*, 1991; Timenetsky *et al.*, 1993).

Dentre os mais de 20 diferentes agentes infecciosos associados com o quadro de diarreias em crianças, os rotavírus são a causa mais comum de diarreia grave (Glass *et al.*, 2005). A ocorrência universal dos rotavírus é amplamente reconhecida e sabe-se que praticamente todas as crianças aos cinco anos já apresentaram pelo menos um episódio de infecção por esse patógeno (Parashar *et al.*, 2003; Brasil, 2006). Outros vírus também relacionados a quadros de diarreias são os astrovírus, os adenovírus e os calicivírus (Conner e Ramig, 1997).

Dados epidemiológicos recentes indicam que a proporção de hospitalizações decorrentes de diarreias atribuídas aos rotavírus continua crescendo. Anualmente, esse vírus causa 611 mil mortes em crianças com idade inferior a cinco anos em todo o mundo. Mais de 80% dessas mortes ocorrem em países de baixa renda do sul da Ásia e da África (Parashar *et al.*, 2006).

No Brasil, em função da magnitude das diarreias agudas foi instituída, em 2004, a Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas – MDDA, um sistema de vigilância sentinela que, atualmente, está implantado em 4.379 (78,8%) municípios do País. Em 2004, foram notificados ao Ministério da Saúde, pela MDDA, 2.395.485 casos de diarreia. O impacto na saúde pública das doenças diarréicas agudas em crianças menores de cinco anos também pode ser demonstrado pela quantidade de recursos destinados ao pagamento de internações hospitalares por esses agravos. No período de 1995 a 2004, foram gastos aproximadamente 173 milhões de reais, concentrados principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste do País (Brasil, 2006).

Nas últimas duas décadas, vários organismos, incluindo a Organização Mundial da Saúde e a Aliança Global para Vacinas e Imunização, avaliaram a necessidade de desenvolvimento de novas vacinas e identificaram que a vacina contra os rotavírus humanos era prioritária (Glass *et al.*, 2005). Recentemente, foram concluídos os ensaios clínicos de duas vacinas orais contra os rotavírus. Uma delas foi licenciada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) em julho de 2005 e já foi introduzida no calendário básico de imunizações para crianças brasileiras menores de seis meses de idade (Brasil, 2006).

Os rotavírus apresentam uma grande diversidade genética e sorológica. Os diferentes genótipos e sorotipos desses vírus têm uma distribuição variável do ponto de vista temporal e geográfico. Segundo Santos e Hoshino (2005), as formulações das futuras vacinas contra os rotavírus deverão levar em consideração esses aspectos da epidemiologia do vírus. Conhecer a distribuição dos genótipos e sorotipos de rotavírus se torna ainda mais relevante nos países em desenvolvimento, de dimensões continentais e com diferentes realidades sócio-econômicas, culturais e geográficas como é o caso do Brasil.



## ***1.2. Aspectos históricos das infecções causadas por rotavírus***

Os relatos de diarreias em seres humanos são anteriores a Hipócrates. Porém, só no século XIX, os avanços da bacteriologia e da parasitologia levaram à elucidação da etiologia de uma parte das doenças diarreicas. Apesar desses avanços, logo ficou evidente que uma proporção significativa das epidemias de diarreia e das gastroenterites infantis não podia ser atribuída a esses agentes. Por exclusão, assumiu-se que muitas das gastroenterites agudas deveriam ser causadas por vírus (Kapikian AZ, 1997).

Durante as décadas de 1940 e 1950, foram realizados diversos experimentos demonstrando a possibilidade de indução de gastroenterites através da administração oral de filtrados fecais livres de bactérias em voluntários (Kapikian AZ, 1997). Entretanto, a etiologia viral de gastroenterites em humanos só foi comprovada por Bishop *et al.*, em 1973, na Austrália. Esses pesquisadores, analisando por microscopia eletrônica cortes ultrafinos de biópsias de duodeno de crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda, demonstraram a presença de partículas virais com aproximadamente 70 nm de diâmetro. Posteriormente, foi possível verificar que essas partículas virais eram facilmente detectadas em suspensões de fezes devidamente processadas para observação por microscopia eletrônica de transmissão. Esses vírus foram denominados “orbivírus”, partículas tipo orbivírus, agentes do tipo “reovírus”, “duovírus” e vírus das gastroenterites virais. Atualmente, esses agentes virais são denominados e classificados como rotavírus (Kapikian AZ, 1997; Flewett *et al*, 1974).

Nas décadas de 1960 e 1970 foi possível detectar a presença de partículas do tipo rotavírus no intestino de animais apresentando doenças diarreicas. Estudos sorológicos subsequentes demonstraram que essas partículas eram antigenicamente relacionadas aos rotavírus humanos (Kapikian AZ, 1997).

Os rotavírus foram identificados pela primeira vez no Brasil em 1976, a partir de material fecal proveniente de crianças admitidas em um hospital público de Belém, Pará (Linhares *et al.*, 1977), sucedendo-se múltiplas investigações ao longo das décadas posteriores.

Em 1985, De Zoysa e Feachem publicaram um trabalho de revisão, relatando a prevalência mundial das doenças causadas por rotavírus. As análises realizadas por esses autores mostraram que os rotavírus eram responsáveis por 6% dos episódios de diarreia e 20% das mortes causadas por diarreias em crianças menores de cinco anos dos países em desenvolvimento. Verificou-se que a incidência das doenças causadas por rotavírus era similar em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sugerindo que o controle não seria obtido por meio de melhoria do fornecimento de água tratada, nem de medidas de higiene e saneamento. Conseqüentemente, foi recomendado o desenvolvimento de vacinas contra os rotavírus que pudessem ser amplamente utilizadas, prevenindo assim a doença grave e fatal causada por esses vírus (De Zoysa e Feachem, 1985; Parashar *et al.*, 2003).

Em agosto de 1998, foi licenciada nos Estados Unidos da América – EUA, uma vacina recombinante contendo quatro linhagens de rotavírus. A vacina trivalente com rotavírus isolados de rhesus foi denominada Rotashield<sup>®</sup>. Recomendou-se então a imunização rotineira de crianças americanas utilizando-se essa vacina. Entretanto, nove meses depois, o uso da Rotashield<sup>®</sup> foi suspenso em conseqüência de uma série de relatos de uma possível associação da vacina com o quadro de intussuscepção intestinal observado em crianças imunizadas. Após a confirmação dessa associação, foi recomendada a suspensão do uso da Rotashield<sup>®</sup> e o fabricante Wyeth-Ayerst Company interrompeu a sua fabricação (Parashar *et al.*, 2003; Glass *et al.*, 2005).

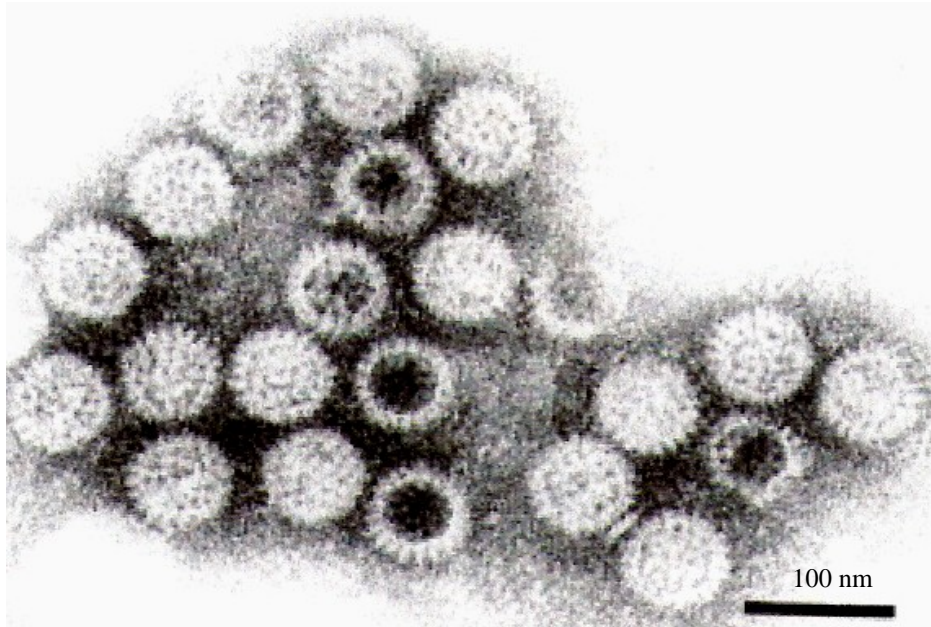
Apesar dos problemas observados com o uso da vacina Rotashield<sup>®</sup>, dada a importância das diarreias, a morbidade e a mortalidade causadas pelos rotavírus, algumas vacinas encontram-se atualmente em fase de teste e de aprovação em vários países (Glass *et al.*, 2005). A discussão do estado da arte das vacinas contra os rotavírus será retomada no item 1.9.

### ***1.3. Classificação dos rotavírus***

Os rotavírus pertencem à família *Reoviridae*, apresentando um capsídeo de simetria icosaédrica. Esse envoltório de natureza protéica é constituído de camadas concêntricas organizadas em um, dois e três capsídeos distintos, com diâmetro aproximado de 70 nm .

A família *Reoviridae* é constituída por nove gêneros que podem ser divididos em dois grupos. Um grupo compreende os vírus em que as partículas intactas possuem projeções relativamente grandes situadas nos 12 vértices da estrutura icosaédrica. Os gêneros *Orthoreovirus*, *Cypovirus*, *Aquareovirus*, *Fijivirus* e *Oryzavirus* apresentam tal característica. O segundo grupo inclui aqueles gêneros com um capsídeo mais liso ou quase esférico e sem grandes projeções nos eixos pentaméricos. Esse grupo é caracterizado pelos gêneros *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus* e *Phytoreovirus*. As partículas virais da família *Reoviridae* apresentam 10, 11 ou 12 segmentos genômicos constituídos de RNAs de fita dupla lineares (van Regenmortel *et al.*, 2000).

O gênero *Rotavirus* apresenta partículas com aspecto de roda, do latim – “rota”, do qual deriva o nome atribuído a esses vírus. A figura 1 ilustra a estrutura das partículas virais em microscopia eletrônica de transmissão.



**Figura 1-** Partículas de rotavírus visualizadas por imunomicroscopia eletrônica a partir de filtrados de fezes de crianças com gastroenterite aguda. A barra representa 100 nm e as partículas virais possuem 70 nm de diâmetro. Fonte: Parashar *et al.*, 1998.

O capsídeo viral possui três camadas protéicas e envolve 11 segmentos de RNAs de fita dupla. Esse gênero só infecta animais vertebrados e é transmitido pela via oral-fecal (Estes MK, 1996; Parashar *et al.*, 1998; van Regenmortel *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2004).

De acordo com o Relatório do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (van Regenmortel *et al.*, 2000), os rotavírus são classificados em cinco espécies, RV-A a RV-E, com duas espécies tentativas adicionais: RV-F e RV-G. Os vírus das diferentes espécies são descritos como incapazes, em condições normais, de trocar segmentos genômicos. Cada espécie representa, portanto, um conjunto separado de genes. Essa característica é observada também nos outros gêneros da família *Reoviridae*. Os membros de uma mesma espécie de rotavírus são identificados por seis características principais:

- 1 - A habilidade de trocar material genético por meio do intercâmbio de segmentos genômicos durante as infecções mistas, produzindo progênies de linhagens virais viáveis;
- 2 - Altos níveis de reações cruzadas em ELISA, usando-se anticorpos monoclonais ou policlonais;
- 3 - Alto nível de conservação das seqüências de RNA nas regiões terminais ou próximas às terminações genômicas;
- 4 - Alto nível de similaridade das seqüências de RNA nos segmentos genômicos conservados. Os vírus da mesma espécie apresentam menos de 10% de variação na seqüência do segmento 6 do genoma, que codifica a proteína VP6. Os vírus de espécies diferentes normalmente apresentam mais de 30 % de variação na seqüência do segmento 6 do genoma. Essas diferenças se refletem na seqüência de aminoácidos das proteínas virais;
- 5 - Identificação de um sorotipo viral com um vírus já classificado em uma espécie de rotavírus. Nenhum dos sorotipos de espécies diferentes apresenta neutralização cruzada com sorotipos de outras espécies e;
- 6 - Identificação do espectro de hospedeiros. Por exemplo, a espécie RV-E só é encontrada infectando suínos. RV-D e as espécies tentativas RV-F e RV-G só foram isoladas de aves.

Os pesquisadores envolvidos na caracterização dos rotavírus costumam denominar as espécies virais como grupos, nomenclatura que passaremos a adotar, por ser mais usual na literatura específica da área.

Os rotavírus do grupo A são considerados como os principais responsáveis pelas gastroenterites agudas graves em crianças de países desenvolvidos e em desenvolvimento. Os representantes do grupo B, que também infectam humanos, apresentam importância epidemiológica na China e Bangladesh, onde são associados a epidemias anuais de diarreia severa principalmente em adultos. O grupo C tem sido relatado esporadicamente em

espécimes fecais de crianças com diarreias, mas o seu significado clínico ainda não foi estabelecido (Estes MK, 1996; Santos e Hoshino, 2005).

O capsídeo externo dos rotavírus do grupo A consiste de duas proteínas, denominadas VP7 e VP4, que apresentam antígenos com propriedades neutralizantes e imunologicamente protetoras independentes. Em função disso, costuma-se utilizar um sistema binário de classificação dos rotavírus A para designar a neutralização específica para essas duas proteínas. A proteína VP7 é designada como G, por ser uma glicoproteína. A proteína VP4 é designada P, pois essa proteína é sensível à protease. Com base na especificidade antigênica das proteínas do capsídeo externo, VP4 e VP7, os rotavírus do grupo A são classificados ainda em sorotipos e/ ou genótipos. Os sorotipos são determinados pela reatividade do vírus em ensaios de neutralização, usando-se soro hiperimune ou anticorpos monoclonais. Os genótipos são determinados pelo seqüenciamento, amplificação ou hibridização dos genes que codificam essas proteínas (Santos NSO, 2002).

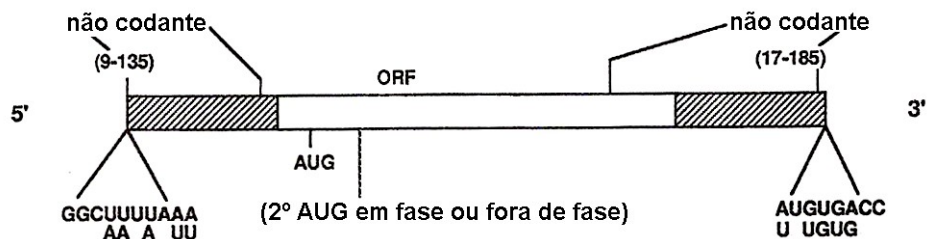
Na literatura já foram descritos 14 sorotipos G e a designação de tais sorotipos é idêntica à denominação de genótipos G. Do total de 14 genótipos G descritos, dez já foram isolados de humanos. São eles os G1 a G6, G8 a G10 e o G12. Recentemente, foi descrito um novo genótipo G, isolado na Índia a partir de bovinos. Esse isolado ainda não foi testado por ensaio de neutralização para definição do sorotipo (Santos e Hoshino, 2005; Castello *et al.*, 2006)

Os sorotipos e os genótipos denominados como P não são coincidentes. Para diferenciar sorotipos de genótipos, os primeiros são descritos pela letra P, seguido de um número e os últimos pela letra P, seguida de números entre colchetes. Até o momento, foram descritos 14 sorotipos P, nove foram isolados de humanos e 26 genótipos P, dez

infectando humanos. Como os genes que codificam as proteínas VP4 e VP7 podem se segregar de maneira independente, várias combinações entre P e G podem ser detectadas na natureza (Santos e Hoshino, 2005; Castello *et al.*, 2006).

#### 1.4. Estrutura das partículas virais

Como mencionado anteriormente, os rotavírus apresentam três camadas concêntricas de proteínas que envolvem o genoma composto de 11 segmentos de RNA de dupla fita. O tamanho desses RNAs varia de 663 a 3302 pares de bases (pb). O tamanho completo do genoma apresenta em média 18550 pb. Cada segmento de dsRNA apresenta uma guanina na extremidade 5' seguida por uma sequência conservada de nucleotídeos, que é parte da região não codificadora dessa extremidade do genoma. Segue-se uma região aberta de leitura, correspondente à proteína codificada pelo gene e uma outra região não codificadora com uma sequência também conservada. A figura 2 mostra a organização dos segmentos do dsRNA de rotavírus (Estes MK, 1996).

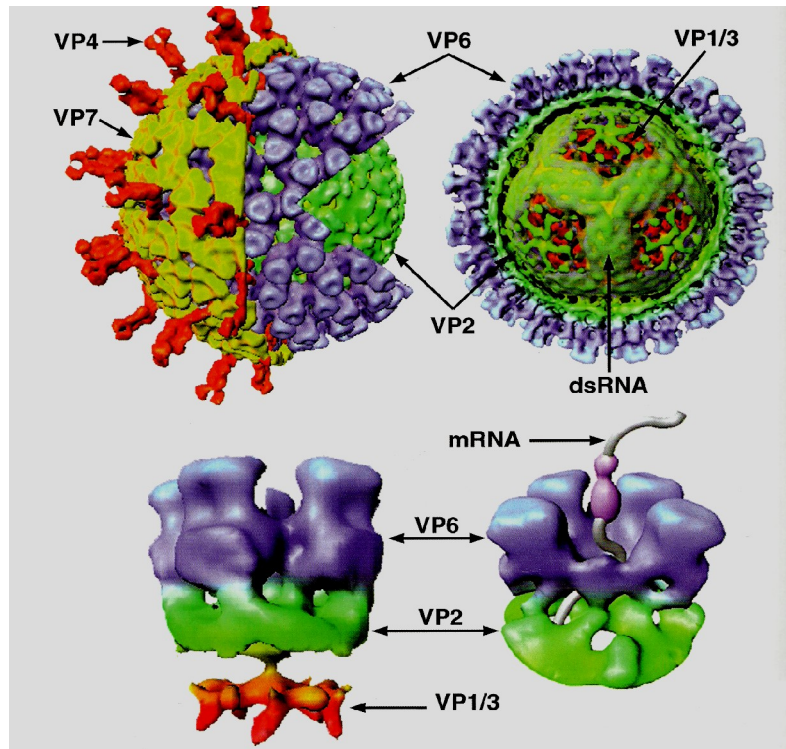


**Figura 2** - Principais características da estrutura do genoma dos rotavírus. Na extremidade 5' e 3' as regiões não codificadoras, indicando os nucleotídeos conservados (região achurada). Em branco a região codificadora. Modificado de Estes MK, 1996.

Os mRNA codificados pelos segmentos genômicos apresentam *cap*, ou seja, uma guanina metilada na extremidade 5', mas não apresentam sinal de poliadenilação na extremidade 3' (van Regenmortel *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2004).

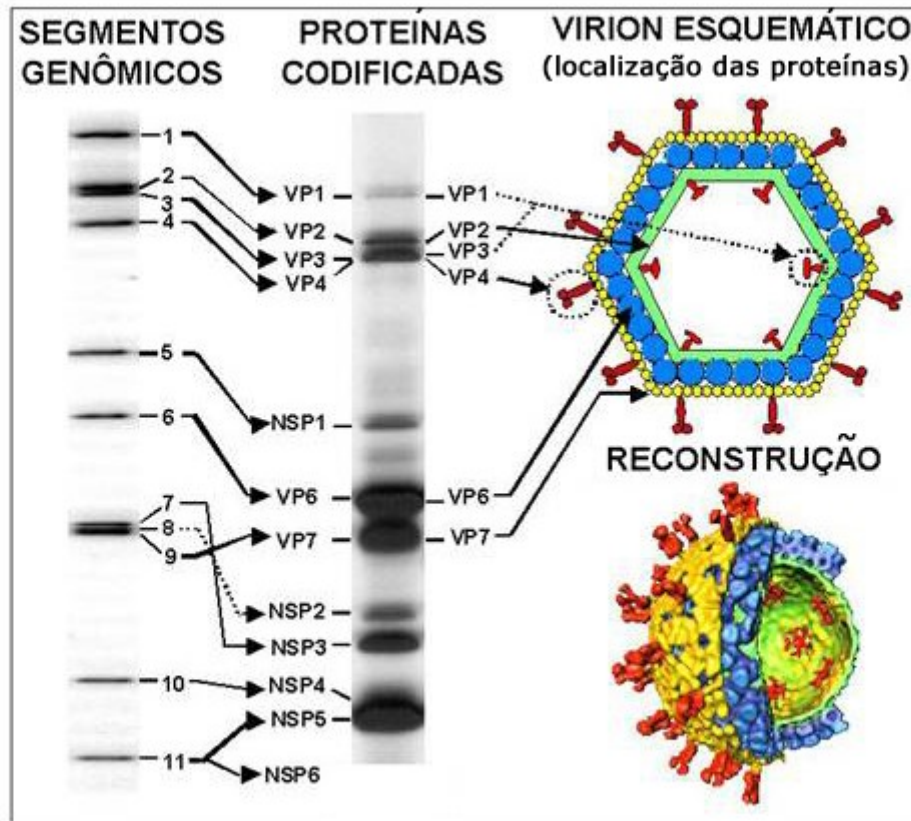
O vírion apresenta seis proteínas estruturais com localização na partícula viral já definida. O envoltório protéico mais interno é constituído por 120 moléculas da proteína VP2, que circunda o genoma. Doze cópias das proteínas VP1 e VP3 constituem o *core* da partícula viral. A adição de 260 trímeros de VP6 sobre VP2 dá origem ao segundo envoltório protéico, constituindo partículas denominadas *double-layered particles* (DLPs). O envoltório mais externo é constituído de 780 cópias da glicoproteína VP7, organizada em trímeros, e de 60 estruturas em forma de espículas formadas por dímeros de VP4. Esses dímeros se projetam aproximadamente 12 nm na superfície de VP7. As partículas virais que apresentam os três envoltórios são denominadas *triple-layered particles* (TLPs). A Figura 3 mostra a estrutura das partículas virais e as seis proteínas estruturais encontradas no vírion.





**Figura 3** - Ilustração das três camadas protéicas concêntricas que compõem as partículas virais dos rotavírus. A camada mais externa é constituída por VP4 e VP7. A camada intermediária é formada por VP6 e a mais interna por VP2, VP1 e VP3. Uma das moléculas de RNA viral também pode ser observada. Fonte: van Regenmortel *et al.*, 2000.

Além das seis proteínas estruturais (VPs), o genoma viral codifica ainda seis proteínas não estruturais, NSP1 a NSP6, que participam na replicação do vírus (van Regenmortel *et al.*, 2000). A Figura 4 indica as proteínas codificadas por cada um dos 11 segmentos do genoma viral.



**Figura 4-** Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando cada um dos 11 segmentos de RNA de fita dupla e as proteínas codificadas pelo genoma dos rotavírus. VP-1 a VP-7 são as proteínas estruturais. NSP-1 a NSP-6 são as proteínas não estruturais. Adaptado de Eric *et al.*, acessado em junho de 2006.

[http://www.iah.bbsrc.ac.uk/dsRNA\\_virus\\_proteins/rotavirus%20figure.htm](http://www.iah.bbsrc.ac.uk/dsRNA_virus_proteins/rotavirus%20figure.htm)

Por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) esses vírus têm sido agrupados de acordo com o padrão de migração dos segmentos genômicos. Observa-se que os 11 segmentos de RNA dos rotavírus A migram sempre em quatro grupos distintos de acordo com massa molecular: o primeiro grupo com quatro segmentos, o segundo com dois, o terceiro com três e o quarto com dois. A migração dos segmentos 10 e 11, em particular, define os padrões “longo” e “curto” dos rotavírus do grupo A (Lourenço *et al.*,

1981). O perfil denominado curto atípico é resultado de uma duplicação parcial na terminação 3' do gene 11, o que promove a sua migração mais lenta. O perfil longo é definido pelo gene 11 com tamanho esperado (Matsui *et al.*, 1990; Gentsch *et al.*, 2005).

### ***1.5. As proteínas virais***

A proteína VP1 é a maior proteína estrutural do vírus e apresenta atividade de RNA polimerase dependente de RNA, sendo encontrada em associação com o RNA viral. VP2 é a proteína mais abundante do interior da partícula viral. Também possui propriedade de se associar ao RNA viral. A partir da sequência deduzida de aminoácidos, foi possível verificar que VP2 apresenta dois motivos do tipo zíper de leucina, o que sugere a formação de dímeros nas proteínas que têm propriedade de se ligar a ácidos nucleicos. VP3 apresenta atividade de guaniltransferase e provavelmente está envolvida na adição do *cap*, presente na extremidade 5' de todos os mRNAs virais. A proteína VP6 constitui a segunda camada protéica da partícula viral. As duas últimas proteínas estruturais, VP4 e VP7, constituem o envoltório externo (Estes e Cohen, 1989; van Regenmortel *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2004).

VP4 possui um sítio de clivagem por tripsina. A clivagem dessa proteína gera dois produtos protéicos, VP5\* e VP8\*, o que aumenta a infectividade viral. A entrada dos rotavírus nas células provavelmente é dependente dessa clivagem, o que provavelmente não interfere na ligação do vírus à célula. VP7 é uma proteína glicosilada codificada pelo segmento sete, oito e nove do genoma. O segmento nove contém dois códons de iniciação na mesma região aberta de leitura. O primeiro apresenta uma sequência Kosak fraca, o que dá origem a duas formas protéicas de VP7 (van Regenmortel *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2004).

O genoma viral codifica ainda seis proteínas não estruturais. A maior delas, NSP1, é a mais variável de todas as proteínas dos rotavírus, podendo apresentar até 65% de diversidade de seqüência entre linhagens de RV-A. Apesar dessa variação, NSP1 apresenta um motivo conservado, rico em cisteína, o que sugere a presença de um domínio do tipo dedo de zinco. Esse domínio é encontrado em proteínas que se ligam a ácidos nucléicos e tem sido demonstrado experimentalmente que essa proteína se liga a RNAs de fita simples. NSP1 parece estar envolvida nos estágios iniciais da montagem das partículas virais, que inclui a seleção dos segmentos genômicos que serão encapsidados (van Regenmortel *et al.*, 2000).

NSP2 tem papel direto no mecanismo de replicação viral, apresentando a propriedade de se ligar de maneira inespecífica a RNA de fita simples e dupla. NSP3 também é encontrada em associação com intermediários replicativos precoces, sugerindo o seu papel na morfogênese viral. NSP3 interage com fatores de iniciação da síntese protéica em células humanas, substituindo a proteína de ligação às caudas de poli A e promovendo a interrupção da síntese de proteínas celulares. NSP4 é uma proteína modificada pós-traducionalmente pela adição de açúcares N ligados. Já foi demonstrado que NSP4 está envolvida nos estágios terminais da maturação viral no retículo endoplasmático e, recentemente, foi demonstrado que essa proteína apresenta atividade de enterotoxina (van Regenmortel *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2004).

As duas últimas proteínas não estruturais, NSP5 e NSP6, são codificadas em duas regiões abertas de leitura diferentes no mesmo segmento genômico. NSP5 é rica em serina e treonina e é modificada pós traducionalmente por fosforilações e adição de açúcares O ligados. Também apresenta atividade de ligação a RNA, mas sua função nessa ligação ainda não é conhecida. Essa proteína também parece estar envolvida na organização de

viroplasmas. A proteína NSP6 também é fosforilada e está localizada nos viroplasmas (van Regenmortel *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2004).

O quadro I apresenta uma síntese das proteínas codificadas por cada um dos segmentos genômicos com suas respectivas funções.

**Quadro 1-** Proteínas codificadas por cada um dos segmentos genômicos dos rotavírus e suas respectivas funções. Adaptado de van Regenmortel *et al.*, 2000.

Segmento genômico	Proteína codificada	Funções das proteínas
1	VP1	RNA polimerase dependente de RNA.
2	VP2	Proteína com capacidade de ligação a RNA. Possui domínio de zíper de leucina.
3	VP3	Guanililtransferase.
4	VP4	Proteína de superfície que forma espículas e se liga à célula. A clivagem em VP5* e VP8* aumenta a infectividade das partículas virais. Antígeno de neutralização do tipo P.
5	NSP1	Proteína viral que apresenta maior diversidade genética intra-específica. Possui domínio de dedo de zinco e se liga a RNA. Participa nos estágios iniciais da montagem das partículas virais.
6	VP6	Principal proteína estrutural da partícula viral. Constitui o envoltório protéico intermediário.
7	NSP3	Ligação à extremidade 3' dos mRNAs virais. É encontrada em associação com o citoesqueleto.
8	NSP2	Apresenta a propriedade de se ligar de maneira inespecífica aos RNAs virais de fita simples. Participa da formação dos viroplasmas.
9	VP7	Glicoproteína envolvida na entrada dos vírus na célula. Antígeno de neutralização do tipo G.
10	NSP4	Glicoproteína transmembrana associada ao retículo endoplasmático. Tem papel importante na morfogênese viral. Atua como enterotoxina viral.
11	NSP5	Proteína fosforilada e glicosilada que apresenta atividade de quinase e de ligação a RNA. Interage com NSP6, formando corpúsculos virais de inclusão.
	NSP6	Produto da segunda região aberta de leitura do último segmento genômico. Interage com NSP e é encontrada nos corpúsculos de inclusão.

### **1.6. Replicação**

Os estágios iniciais da replicação dos rotavírus envolvem a ligação de VP4 aos receptores celulares e a entrada na célula. Dentre os receptores celulares envolvidos na entrada dos rotavírus destacam-se alguns tipos de integrinas e de gangliosídeos. O papel de VP7 nos estágios iniciais da infecção viral ainda não foi elucidado, embora já tenha sido demonstrado que essa proteína interage com a superfície celular logo após a ligação das espículas aos receptores. A entrada do vírus na célula parece ser dependente do tratamento com tripsina, o que resulta na clivagem específica de VP4 em VP8\* e VP5\* (Estes MK,1996; van Regenmortel *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2004).

Logo após a entrada do vírus na célula, a partícula contendo os três envoltórios protéicos (TLP) é desnudada, o que envolve a perda do envoltório mais externo e a manutenção das partículas virais contendo dois envoltórios protéicos. Essas partículas, denominadas DLPs, são ativas na transcrição (Arias *et al.*, 2004).

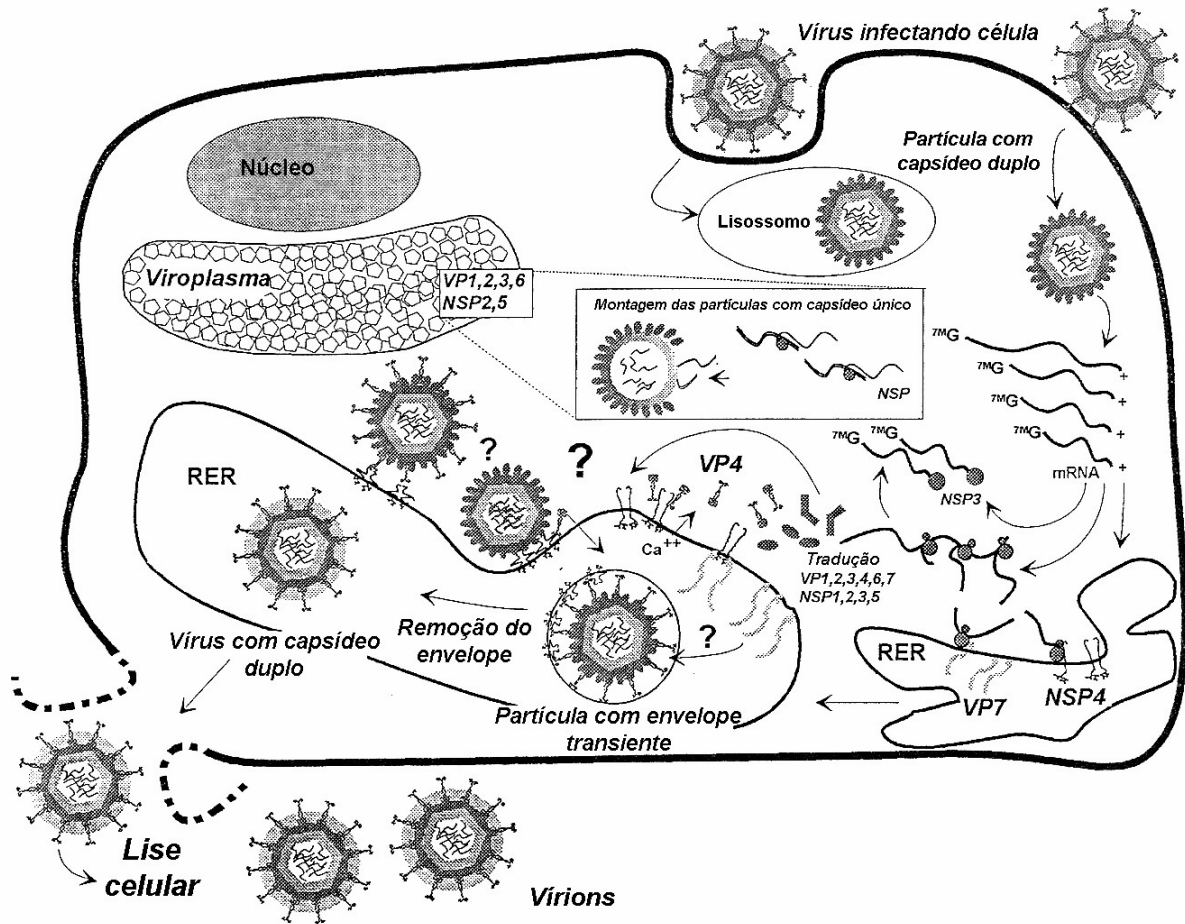
A proteína VP1, que tem atividade de RNA polimerase dependente de RNA, sintetiza os primeiros transcritos virais, que são liberados das partículas para o citoplasma celular através de canais localizados nos vértices pentaméricos dos capsídeos (Figura 3). Esses transcritos de RNA, funcionando como mRNAs, servem de molde para a síntese das seis proteínas estruturais e das seis proteínas não estruturais do vírus (Estes MK,1996; van Regenmortel *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2004).

Os RNAs de fita simples positivos também servem de molde para a síntese de novos RNAs negativos que dão origem aos segmentos genômicos de RNAs de dupla fita. As proteínas se acumulam no citoplasma em estruturas denominadas viroplasmas. Esse processo dá origem a partículas virais contendo RNAs de dupla fita e partículas virais com

uma dupla camada protéica. Essas partículas são responsáveis por uma segunda etapa de transcrição, que resulta na síntese de mais partículas com uma dupla camada protéica.

As partículas agora iniciam um brotamento para o interior do retículo endoplasmático, mediado pela interação das partículas com a proteína NPS4 localizada na membrana dessa organela celular. Durante o brotamento as partículas virais adquirem um envelope transitório. Essas partículas têm esse envelope substituído pela camada protéica externa, constituída de VP4 e VP7, bem como pequenas quantidades de outras proteínas não estruturais. O mecanismo de remoção do envelope lipoprotéico ainda não foi completamente esclarecido, mas sabe-se que esse processo de maturação das partículas virais é dependente de cálcio (Estes MK,1996; van Regenmortel *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2004).

Uma série de eventos intracelulares, provavelmente envolvendo a proteína NSP4, leva a liberação de cálcio do retículo endoplasmático. O aumento da concentração de cálcio no citoplasma dispara diversos processos celulares, incluindo a desestruturação do citoesqueleto. As partículas virais são posteriormente liberadas por lise celular (Estes MK,1996; van Regenmortel *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2004; Ramig RF, 2004). A figura 5 resume as etapas da replicação dos rotavírus nas células infectadas.



**Figura 5-** Representação esquemática do ciclo de replicação dos rotavírus no citoplasma de uma célula infectada. Após a entrada do vírus na célula, inicia-se a transcrição dos mRNAs, dos RNAs genômicos e a síntese das proteínas. Esses componentes são direcionados para viroplasma e, posteriormente, para o retículo endoplasmático rugoso (RER), onde adquirem um envelope transitório. A liberação das partículas ocorre por lise celular. Adaptado de Estes MK, 1996.

Como discutido anteriormente, os rotavírus possuem um genoma de RNA de dupla fita que se replica no citoplasma das células infectadas. Essas moléculas de RNA permanecem sempre envolvidas por capsídeos e não são encontradas livremente no citoplasma. Isso provavelmente impede que o genoma dos rotavírus seja detectado pelos mecanismos de defesa das células que envolvem silenciamento gênico dependente de



RNAs de dupla fita (Arias *et al.*, 2004). O fenômeno do silenciamento gênico já foi descrito em células vegetais e animais. Em mamíferos, a presença dos RNAs de dupla fita induz uma resposta inespecífica mediada por interferon, mas também os mecanismos específicos de degradação de RNAs, envolvendo a enzima *dicer*. Vários estudos estão sendo conduzidos utilizando-se a abordagem do silenciamento gênico tanto para o entendimento do ciclo de replicação dos rotavírus, quanto para definir a função de proteínas celulares potencialmente importantes na infecção por esse vírus. O genoma segmentado dos rotavírus faz desses agentes um alvo excelente do uso do silenciamento gênico para fins de pesquisa e, possivelmente, terapêutico (Arias *et al.*, 2004).

### ***1.7. Transmissão e patogênese das infecções por rotavírus***

O rotavírus pode ser transmitido pela via fecal-oral, pessoa a pessoa e pela ingestão de água e alimento contaminado. Entretanto, há evidências da propagação desses agentes pelo trato respiratório, a partir de aerossóis (Linhares *et al.*, 1981). A excreção de um indivíduo com diarreia aguda por rotavírus pode conter até  $10^{12}$  partículas/mg de fezes, sendo que a carga infectante é de apenas 10 partículas viáveis, denotando a elevada infectividade dos rotavírus (Bishop RF, 1996).

Estudos realizados em ambientes hospitalares, em crianças com quadro de diarreia aguda, apresentam maior incidência de infecções por rotavírus do que os estudos conduzidos em ambulatórios (Bresee *et al.*, 1999 e Linhares AC, 2000).

Infecções assintomáticas por rotavírus também têm sido relatadas, geralmente associadas a indivíduos que convivem em comunidades fechadas, como creches, escolas, hospitais e casas de repouso e que funcionam como possíveis reservatórios da infecção (Linhares *et al.*, 1981).

O entendimento da patogênese das infecções por rotavírus tem sido possível principalmente quando são utilizados modelos animais. Os rotavírus se replicam em enterócitos maduros que não mais se dividem, sugerindo que essas células já diferenciadas expressam fatores necessários para a eficiência da infecção e da replicação (Ramig RF, 2004).

A gravidade e a localização da infecção intestinal por rotavírus variam entre as espécies animais e entre os estudos. No entanto, as mudanças patológicas observadas geralmente são limitadas ao intestino delgado. O processo inflamatório costuma ser mais incipiente se comparado com outros patógenos intestinais. Entretanto, a infecção por rotavírus altera a função do epitélio do intestino delgado, resultando em quadros de diarreia (Ramig RF, 2004). As lesões decorrentes da infecção por rotavírus ocorrem na mucosa jejunal, podendo alcançar o íleo. Várias alterações são observadas, tais como: atrofia das vilosidades, hipertrofia das criptas, infiltração de células mononucleares na lâmina própria, dilatação das cisternas do retículo endoplasmático, dilatação mitocondrial e escassez das microvilosidades (Kapikian AZ, 1997).

O processo que ocasiona a diarreia tem início quando o rotavírus se liga e infecta os enterócitos no intestino delgado. A ligação é mediada por reações seqüenciais, com uma série de moléculas da superfície celular contendo ou não ácido siálico. Durante a replicação e montagem das partículas virais, a alteração na concentração de cálcio no citoplasma diminui a expressão de enzimas na superfície apical dos enterócitos, inibe os sistemas de transporte de sódio através das membranas e promove a necrose. Esses eventos ocasionam a má absorção característica das diarreias.

A proteína NSP4, caracterizada como uma enterotoxina, parece ser a principal envolvida nas alterações patológicas observadas nas células infectadas. A NSP4 também induz a secreção de íons cloro, ocasionando a perda osmótica de água (Ramig RF, 2004).

### ***1.8. Métodos de detecção dos rotavírus***

A altíssima concentração de partículas de rotavírus excretadas nas fezes durante a fase aguda da enfermidade, possibilitou a padronização de metodologias rápidas para o diagnóstico laboratorial feito diretamente a partir de amostras fecais.

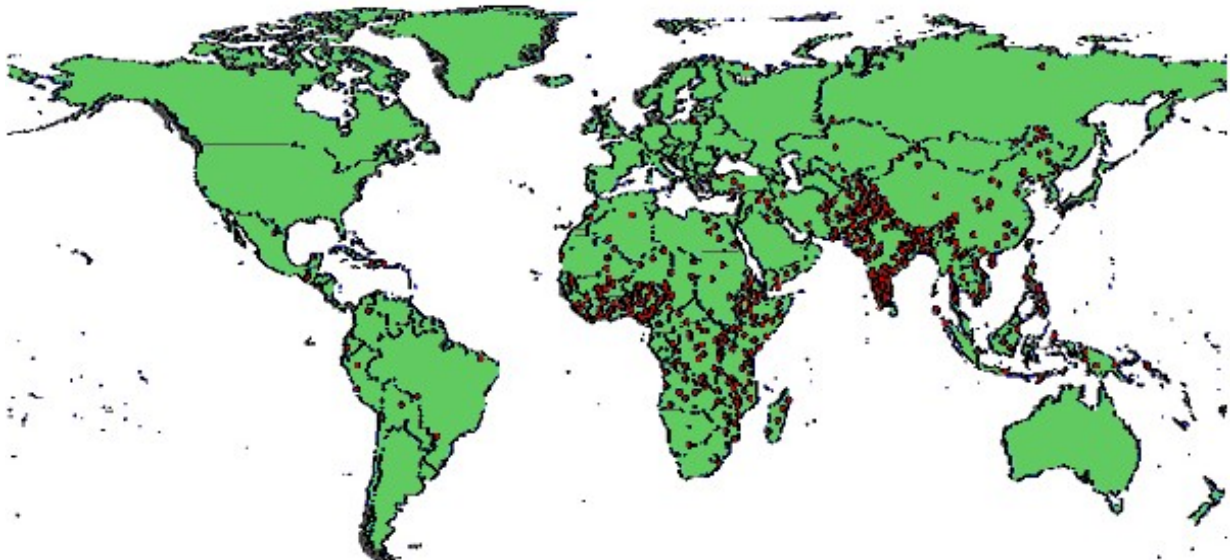
Ao longo dos anos, várias metodologias têm sido utilizadas para o diagnóstico dos rotavírus, sendo as mais comumente empregadas: a microscopia eletrônica direta (MED) (Bishop *et al.*, 1973); a imunomicroscopia eletrônica (IME) (Brandt *et al.*, 1981), a eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE) (Lourenço *et al.*, 1981; Pereira *et al.*, 1983), o ensaio imunoenzimático (EIA) e a aglutinação de microesferas de látex sensibilizadas com anticorpos (Pereira *et al.*, 1985; Brandt *et al.*, 1987; Dennehy *et al.*, 1988). Em 1985, foi desenvolvido por pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz um sistema imunoenzimático do tipo duplo sanduíche para a detecção de rotavírus e adenovírus (Pereira *et al.*, 1985). Essa metodologia tem sido amplamente utilizada no Brasil para fins epidemiológicos.

Com o advento de metodologias moleculares, várias técnicas foram descritas como sendo viáveis para o diagnóstico dos rotavírus. Entretanto, as mais utilizadas têm sido a hibridação molecular utilizando sondas marcadas com enzimas ou isótopos radioativos (Leite *et al.*, 1996) e reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a detecção e caracterização dos genótipos dos rotavírus do grupo A (Gouvea *et al.*, 1990 e Gentsch *et al.*, 1992).

Na tentativa de minimizar o tempo necessário para a genotipagem dos rotavírus por meio de técnicas de PCR, ensaios de microarranjos também já foram desenvolvidos com esse fim. Nesse procedimento, produtos da retrotranscrição dos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7 são hibridizados com sondas imobilizadas para os principais genótipos G e P. Os resultados da genotipagem por microarranjo foram 100% concordantes com os de seqüenciamento (Lovmar *et al.*, 2003).

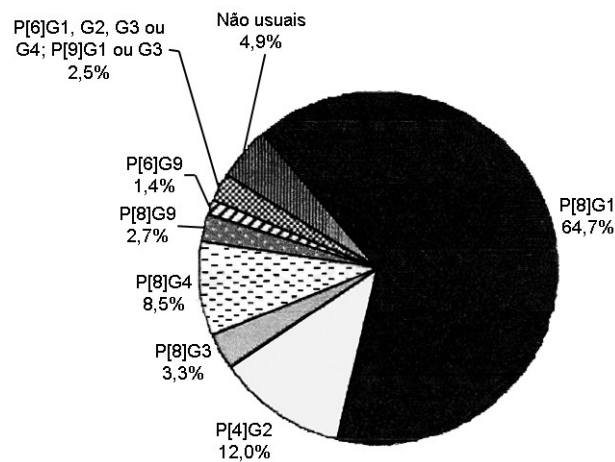
### ***1.9. Epidemiologia***

Estima-se que mais de 55% das mortes causadas por doenças associadas aos rotavírus (231.375 casos) ocorram anualmente na Ásia, seguida pelo continente africano, com aproximadamente 184 mil casos de mortes e América Latina, com 15.178 (Bresee *et al.*, 2005). A figura 6 mostra a distribuição de casos de mortes por região do mundo.



**Figura 6** - Distribuição anual dos casos fatais de diarreia por rotavírus no mundo. Cada ponto vermelho representa 1.000 mortes. Fonte: Parashar *et al.*, 2003.

Considerando a distribuição mundial dos genótipos, segundo Santos e Hoshino (2005), os mais freqüentes são o G1P[8], G2P[4], G3P[8] e G4P[8], que respondem por 88,5% das diarreias causadas por rotavírus em todo o mundo. A figura 7 resume a distribuição dos genótipos de rotavírus do grupo A humanos definida a partir da revisão de 124 estudos publicados entre 1989 e 2004 realizados em 52 países dos 5 continentes.

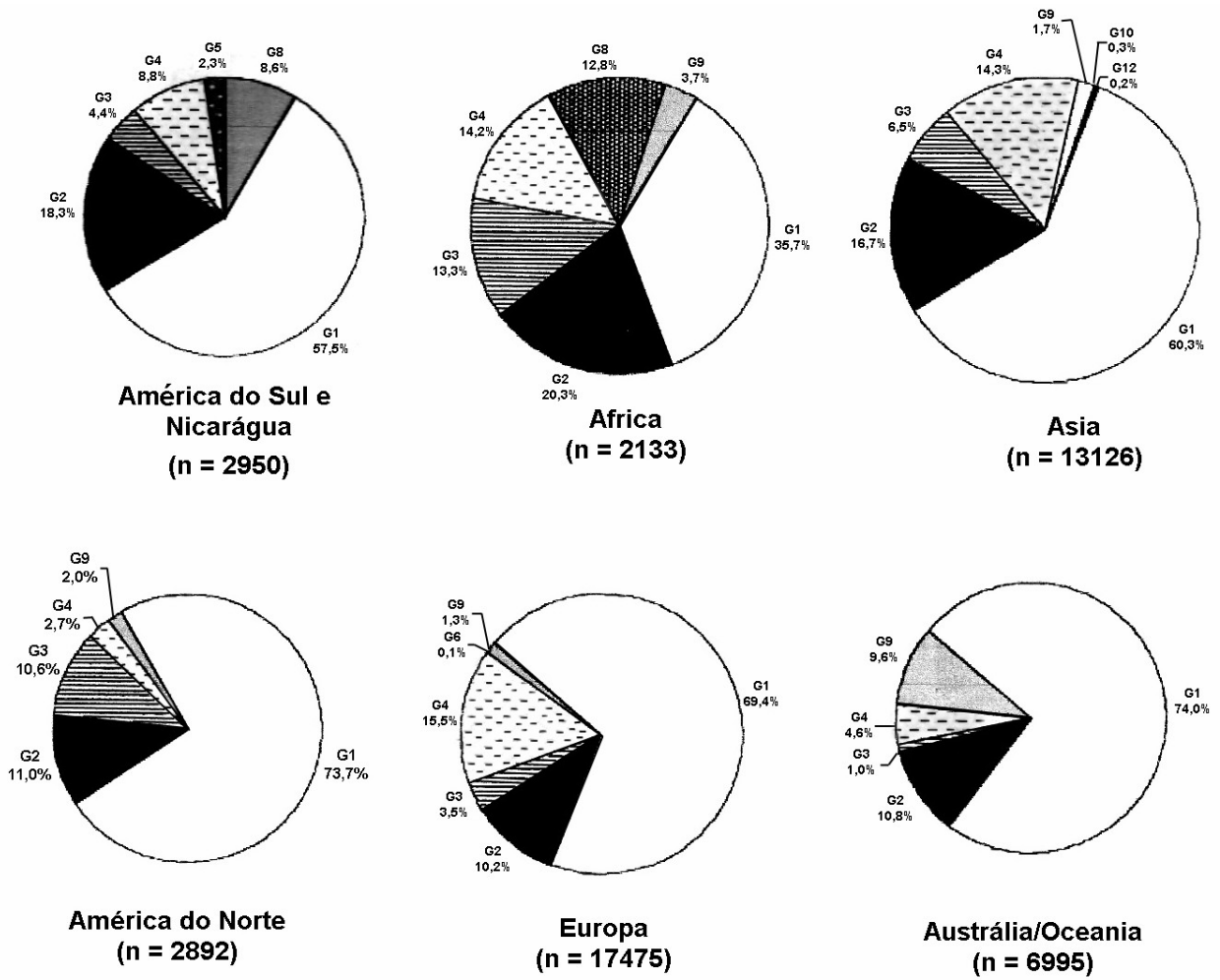


**Figura 7-** Distribuição mundial dos genótipos G e P de rotavírus humanos do grupo A entre crianças a partir de trabalhos publicados entre 1989 e 2004. Adaptado de Santos e Hoshino, 2005.

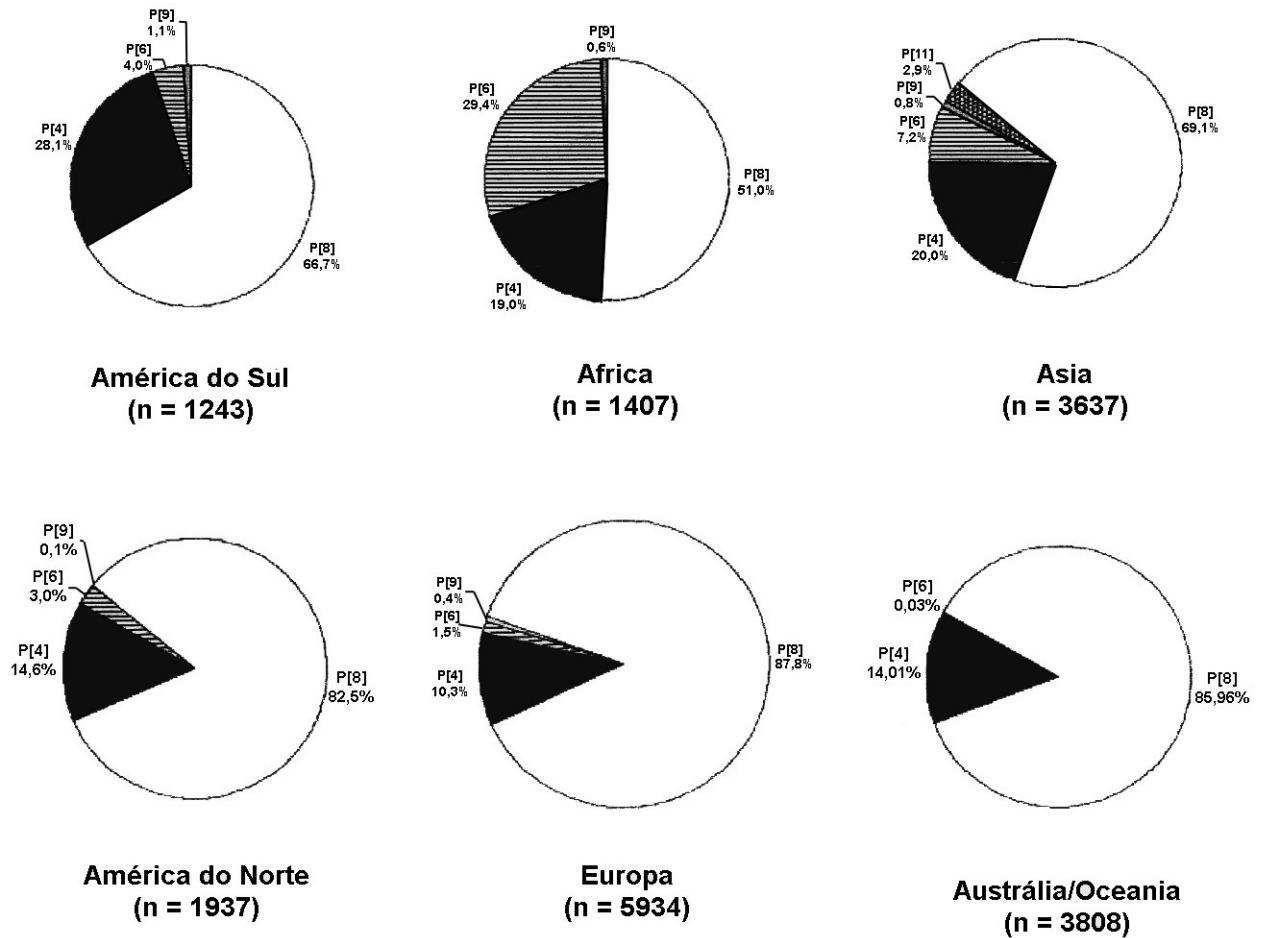
Quando a distribuição de genótipos foi avaliada por continente, ficou evidente que há uma grande variação entre as diversas regiões geográficas. As quatro combinações de genótipos descritas anteriormente como as mais prevalentes no mundo, representaram 90% das infecções por rotavírus na América do Norte, Europa e Austrália. Entretanto, na América do Sul, elas representaram 68% e na África, 50%. A combinação G1 P[8] isoladamente ocorreu em mais de 70% dos casos de infecção por rotavírus na América do Norte, Austrália e Europa, 30% dos casos na América do Sul e Ásia e 23% na África. Nos cinco continentes, o genótipo G1 é o mais prevalente. Na Ásia, América do Norte e Europa

os genótipos G1 a G4 respondem por 97,5% das infecções por rotavírus analisadas. No entanto, na América do Sul, África e Austrália a frequência relativa de G1 a G4 foi de 89%, 83,5% e 90,4% respectivamente. Na África, o genótipo G8 tem sido detectado em uma frequência elevada, sendo considerado o quarto mais freqüente. O genótipo G5 até o momento, só foi detectado na América do Sul, mais especificamente no Brasil, Argentina e Paraguai, além de um isolado na República de Camarões. Até 2002 esse genótipo ainda não havia chegado à América do Norte. O genótipo G9 foi freqüente na Austrália, entre 1973 e 2002, sendo responsável por 9,6% das infecções nessa região geográfica. Na América do Sul, o genótipo G9 foi considerado mais prevalente do que o genótipo G3, sendo o quarto mais freqüente no continente. A frequência de genótipos G1 a G4 na América do Sul se assemelha mais à distribuição da África e Ásia. Já na América do Norte, essa frequência é mais similar àquelas observadas na Europa e Austrália (Linhares e Bresee, 2000; Santos e Hoshino, 2005).

Em relação aos genótipos P, o P[8] é o predominante e os tipos P[8] e P[4] respondem por mais de 90% de todos os casos de diarreia por rotavírus, com exceção da África onde se observa que o padrão de distribuição de P é um pouco diferente. Nessa região, o genótipo P[6] corresponde a aproximadamente um terço de todos os P detectados, sendo o segundo mais freqüente depois do P[8] (Santos e Hoshino, 2005). As figuras 8 e 9 indicam os padrões de distribuição dos genótipos G e P nos diferentes continentes, de acordo com Santos e Hoshino, 2005.



**Figura 8-** Distribuição dos genótipos G nos vários continentes a partir de dados coletados entre 1973 e 2003. Adaptado de Santos e Hoshino, 2005.



**Figura 9-** Distribuição dos genótipos P nos vários continentes a partir de dados coletados entre 1982 e 2003. Adaptado de Santos e Hoshino, 2005.

No Brasil, em 1996, um levantamento realizado por Leite *et al.* em nove estados e no Distrito Federal, indicou a predominância de genótipos similares àqueles descritos em outras partes do mundo, com G1 P[8] ocorrendo em 43% das amostras, G2 P[4] em 12% e G3 P[8] em 6% e G4 P[8] também em 6%. As infecções mistas foram responsáveis por 21% dos casos e genótipos atípicos, como o G5 P[8], G2 P[6], G1 P[9] e G3 P[9] foram observados em 12% das amostras. No mesmo ano, foi publicado por Ramachandran *et al.* um levantamento feito na Índia, em 1993, mostrando a predominância do genótipo G2 P[4]



e G9 P[6], embora 22% das amostras não tenham sido caracterizadas (Linhares e Bresee, 2000; Gentsch *et al.*, 2005). Em 2005, Volotão *et al.*, em um estudo de caracterização de genótipos no Rio de Janeiro relataram o genótipo G1 como o mais prevalente e G9 como o segundo mais prevalente naquela cidade no período entre 2000 e 2004. Nesse estudo, os genótipos G2 e G3 não foram detectados. O genótipo P[8] foi o mais prevalente.

Esses dados de diversidade de frequência de genótipos G e P na várias regiões geográficas em diferentes períodos podem ter implicações importantes na vacinação contra os rotavírus (Gentsch *et al.*, 2005; Santo e Hoshino, 2005).

#### ***1.10. Vacinas contra rotavírus***

Como mencionado anteriormente, a partir do trabalho desenvolvido por De Zoysa e Feachem, em 1985, ficou demonstrado que a incidência da doença causada por rotavírus em países desenvolvidos e em desenvolvimento era semelhante. Conseqüentemente, medidas de saneamento básico não seriam suficientes para controlar a infecção causada por esse vírus, sendo necessário o desenvolvimento de uma vacina que pudesse ser amplamente utilizada em todo o mundo (De Zoysa e Feachem, 1985). Nesse sentido, as vacinas contra rotavírus poderiam ser benéficas mesmo em países desenvolvidos. Nos Estados Unidos, por exemplo, a doença severa causada por rotavírus é associada a 227.000 visitas médicas e 34.000 hospitalizações de crianças com idade inferior a cinco anos (Tucker *et al.*, 1998).

Outros fatores também justificam o desenvolvimento de uma vacina. O desenvolvimento de vacinas tem bases científicas sólidas e a proteção natural contra a infecção por rotavírus já foi observada em crianças que participaram de ensaios com vacinas orais de vírus atenuados. A introdução de uma vacina contra os rotavírus pode

prover benefícios mensuráveis e visíveis para a saúde pública em um período estimado em 2 a 3 anos (Glass *et al.*, 2005).

Em 1999, os esforços mundiais para controlar as gastroenterites causadas por rotavírus foram consideravelmente ameaçados quando a primeira vacina contra os rotavírus licenciada, a Rotashield<sup>®</sup>, foi retirada do mercado em função da sua associação com a intussuscepção intestinal, um evento adverso raro que porém colocava em risco a vida de uma em cada 10.000 crianças submetidas à vacinação (Glass *et al.*, 2005; Glass e Parashar, 2006).

Apesar do risco de outras vacinas contra os rotavírus também serem associadas aos quadros de intussuscepção e da necessidade de se realizar ensaios de larga escala de segurança de novas vacinas, duas empresas já estão, atualmente, desenvolvendo ensaios com duas vacinas contra rotavírus. Os dois novos produtos são denominados RotaTeq, produzida pela Merck Sharp & Dohme e Rotarix, da empresa GlaxoSmithKline e ambas são vacinas orais de vírus atenuados (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006; Vesikari *et al.*, 2006).

A Rotarix<sup>®</sup> é uma vacina monovalente, derivada do genótipo mais comum de rotavírus, o G1P[8], que foi atenuado por uma série de passagens e deve ser administrada em duas doses orais com intervalos de um a dois meses. Essa linhagem vacinal se replica bem no intestino e fornece proteção cruzada contra a maioria dos outros sorotipos (Glass e Parashar, 2006; Ruiz-Palacios *et al.*, 2006).

A RotaTeq<sup>®</sup> é uma vacina pentavalente baseada em uma linhagem de rotavírus que infecta bovinos, a WC3, além de recombinantes de humanos e bovinos. A linhagem WC3 é naturalmente atenuada por humanos, mas não confere ampla proteção cruzada. Desse modo, cada um dos vírus recombinantes contém um gene que codifica a proteína do

capsídeo externo dos sorotipos mais comuns em humanos, são eles: G1, G2, G3 e G4 além do genótipo P[8] (Santos e Hoshino, 2005; Glass e Parashar, 2006; Vesikari *et al.*, 2006).

Apesar dessas diferenças, as duas vacinas demonstraram grande eficácia em relação à doença causada por rotavírus. A RotaTeq<sup>®</sup> foi testada nos EUA e na Finlândia, em 34.035 crianças no grupo vacinal e 34.003 no grupo placebo. A intussuscepção ocorreu em 12 crianças que receberam a vacina e em 15 do grupo tratado com placebo. A eficácia contra os rotavírus dos sorogrupos G1 a G4 foi de 74% e a eficácia contra a gastroenterite grave foi de 98% (Vesikari *et al.*, 2006). A Rotarix<sup>®</sup> foi testada em 31.673 crianças que receberam a vacina e 31.673 tratadas com placebo. Os ensaios foram realizados na Finlândia e em 11 países Latino Americanos: Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, República Dominicana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Peru e Venezuela. A eficácia da vacina contra a gastroenterite grave causada por rotavírus foi de 85%. Seis crianças do grupo vacinal e sete do grupo controle apresentaram quadro de intussuscepção (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006).

Segundo Glass e Parashar (2006), um dos aspectos de maior importância em termos de saúde pública foi a magnitude da redução das hospitalizações por diarreia associada a qualquer causa. Na América Latina, a vacinação com Rotarix<sup>®</sup> reduziu as hospitalizações por diarreia em crianças com idade inferior a um ano em 42%. Nos EUA e na Finlândia, a RotaTeq<sup>®</sup> reduziu internações em 63% também no primeiro ano de vida. Na América Latina, essa redução pode implicar também na diminuição da mortalidade.

No Brasil, em março de 2006, foi iniciada a imunização das crianças com a Rotarix<sup>®</sup>. A vacina é dirigida à população de crianças menores de seis meses de idade, entre um mês e quinze dias e 5 meses e quinze dias de vida, com a intenção de proteger antecipadamente as crianças na faixa etária de 6 a 24 meses, nas quais observa-se o maior número de complicações decorrentes da infecção por rotavírus. Paralelamente, de acordo

com o Ministério da Saúde, em 2006 deverá ser implantada também a vigilância epidemiológica da doença diarréica causada por rotavírus em todos os estados e no Distrito Federal. Quando da ocorrência de surtos, serão coletadas amostras de fezes de crianças menores de 5 anos. Essas amostras deverão ser encaminhadas aos Laboratórios Centrais de Saúde Pública de cada estado para a realização de testes imunoenzimáticos e aos laboratórios de referência para a genotipagem (Brasil, 2006).

À medida que essas vacinas forem sendo licenciadas nos diversos países, o interesse mundial deverá se voltar para o efeito dessas vacinas na redução do número de hospitalizações e dos custos nos países desenvolvidos e para a redução da mortalidade nos países em desenvolvimento. A questão fundamental será determinar se essas vacinas funcionam de maneira similar nas crianças de países em desenvolvimento. As vacinas orais atenuadas precisam ser processadas no intestino das crianças para desencadear uma resposta imune eficaz. A replicação do vírus vacinal é dependente da dose da vacina administrada e de fatores do hospedeiro que podem neutralizar o vírus, tais como: anticorpos maternos, aleitamento, agentes bacterianos e/ou virais interferentes, e má nutrição. Além disso, embora as duas vacinas protejam contra vários sorotipos circulantes, a Rotarix<sup>®</sup> foi menos eficaz na proteção contra G2. É fundamental que os estudos futuros definam como será a eficácia da vacina nas regiões geográficas em que os genótipos não incluídos na vacina são mais prevalentes (Bresee *et al.*, 2005; Glass *et al.*, 2005; Santos e Hoshino, 2005; Glass e Parashar, 2006).

## 2. Objetivos

Os dados existentes sobre a epidemiologia de rotavírus do grupo A no Distrito Federal (Teixeira *et al.*; 1991) foram obtidos por meio de técnicas imunológicas e eletroforese em gel de poliacrilamida. Devido à inexistência de informações sobre os genótipos de rotavírus circulantes no Distrito Federal é de fundamental importância a realização de estudos moleculares, no sentido de elucidar questões como a diversidade genética e a história evolutiva do rotavírus. O presente trabalho teve como objetivos:

### **Geral**

- Iniciar a implantação da metodologia de genotipagem de rotavírus do grupo A no Distrito Federal e determinar os genótipos G dos rotavírus do grupo A identificados nos períodos de 1986 a 1990; de 1994 a 1996 e 2004 a 2005 em crianças com quadro de diarreia aguda infecciosa do Distrito Federal;

### **Específicos**

- Comparar os dados de sorotipagem G e perfil eletroforético com aqueles obtidos por meio da genotipagem de G;
- Gerar dados sobre os genótipos G, que possam subsidiar estudos futuros do impacto da vacina contra os rotavírus do grupo A nesta região geográfica; e
- Realizar a análise filogenética das seqüências obtidas.

### 3. Metodologia

#### 3.1. Amostragem

Todas as amostras utilizadas no presente trabalho foram cedidas pelo Núcleo de Virologia do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal, Lacen-DF. Foram analisadas 103 amostras fecais de crianças até cinco anos de idade, com quadro agudo de diarreia, positivas para rotavírus por pelo menos uma das duas técnicas virológicas de triagem empregadas. A amostragem abrangeu três períodos, a saber: 1º período (**de 1986 a 1990**) trinta e quatro (34) amostras coletadas durante o projeto intitulado “**Aspectos Epidemiológicos das Infecções por Rotavírus no Distrito Federal**”, vigente entre maio de 1986 e setembro de 1990, financiado pela FINEP e CNPq; 2º período (**de 1994 a 1996**) - quarenta e sete (47) amostras coletadas durante a vigência do projeto intitulado “**Etiologia das Diarreias Agudas no Distrito Federal**”, vigente entre maio de 1994 e setembro de 1996, financiado pela FAPDF; 3º período (**de 2004 a 2005**) – vinte e duas (22) amostras encaminhadas por unidades da rede pública de saúde ao Lacen-DF para diagnóstico virológico.

As amostras foram coletadas nos setores de emergências de várias unidades públicas de saúde do Distrito Federal utilizando-se frascos coletores universais, sendo posteriormente encaminhadas sob refrigeração ao Núcleo de Virologia do Lacen-DF.

A representatividade das amostras dos primeiro e segundo períodos foi calculada utilizando-se o programa Epi-6 (CDC), para nível de confiança de 90% e 95%, respectivamente. Para tanto, foi considerada, no primeiro período (n=607) e no segundo período (n= 700), para a população de crianças com diarreia, admitidas no estudo durante a vigência dos dois projetos. Como limite inferior, foi utilizada a frequência de 13%, descrita

por Pereira *et al.* (1994). Como não houve monitoramento sistemático de quadros de diarreia pela Rede Pública de Saúde do Distrito Federal no terceiro período, não foi possível analisar a representatividade das amostras coletadas em 2004 e 2005.

### ***3.2. Preparo das suspensões fecais***

As fezes brutas foram diluídas a 10 % em PBS, pH 7,4 (NaCl 8,0g; KCl 0,2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 H<sub>2</sub>O 2,89g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2g e H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 1000 ml, ajustar o pH com HCl ), homogeneizadas em agitador de tubos Vortex e clarificadas por centrifugação a 700g por 15 minutos (Pereira *et al.*, 1983). Os sobrenadantes foram conservados a -80°C até serem processados por meio das seguintes técnicas virológicas: Ensaio Imunoenzimático Combinado para Rotavírus e Adenovírus (EIARA); extração do RNA viral para posterior utilização nas técnicas de Eletroforese em Gel de Policriamida (PAGE) e Reação em Cadeia pela Polimerase associada à transcrição reversa (RT-PCR).

### ***3.3. Ensaio Imunoenzimático Combinado para Rotavírus e Adenovírus (EIARA)***

Os sobrenadantes das amostras coletadas em todos os períodos foram submetidas à técnica de EIARA para a pesquisa de rotavírus e adenovírus (Pereira *et al.*, 1985), utilizando-se o kit produzido por Bio-Manguinhos, Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz). Nessa técnica, foram utilizados anticorpos policlonais para o antígeno VP6 dos rotavírus do grupo A.

O procedimento consistiu inicialmente da sensibilização por 16 horas a 4°C dos orifícios da microplaca de poliestireno (NUNC) com soro hiperimune de cabra produzido pela inoculação com vírus de símio (SA-11), seguido da adição da amostra fecal (suspensão a 10% em PBS pH 7,4) diluída 1:4.

Após incubação e lavagem, adicionou-se soro hiperimune de cobaia e, também após incubação e lavagem, adicionou-se o conjugado (soro de coelho anti IgG de cobaia marcado com peroxidase). Após nova incubação e lavagem, foi adicionado o substrato (peróxido de hidrogênio/ tetrametilbenzidina), incubado por 15 minutos à temperatura ambiente, quando então procedeu-se a parada da reação com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2M. A leitura da reação foi realizada visualmente e em espectrofotômetro (Behring- EL 311) a 450nm. As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram densidade óptica (DO) duas vezes maior do que os controles de conjugados e substrato na presença de captura para rotavírus. Todas as incubações referidas foram feitas a 40 °C por 30 minutos.

#### **3.4. Extração de RNA viral**

Foi empregada a técnica descrita por Boom *et al.* (1990), com modificações. Para cada 400  $\mu\text{L}$  da suspensão fecal, foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  de tampão L6 (Isotiocianato de guanidina/ 0,1M Tris HCl pH 6,4 / 0,2M EDTA pH 8,0/ Triton X-100) e 1,5  $\mu\text{L}$  de solução de sílica (Sigma S-5631). Após homogeneização, a mistura foi incubada, sob agitação lenta, por 30 minutos, à temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugada a 16.000 x g por 1 minuto, descartando-se o sobrenadante. Foram então adicionados 1000 $\mu\text{L}$  de tampão L2 (Isotiocianato de guanidina/ 0,1M Tris HCl pH 6,4), seguido de homogeneização. Após centrifugação (16.000 x g por 1 min), o sobrenadante foi novamente descartado. Ao precipitado foram adicionados 1000 $\mu\text{L}$  de etanol 70% (acondicionado à temperatura de 4°C a 8°C), com posterior homogeneização. Após centrifugação (16.000 x g por 1 min), o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados ao precipitado 1000 $\mu\text{L}$  de acetona PA, com posterior homogeneização e centrifugação a 16.000 x g por 1 minuto. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi



submetido à temperatura de 56°C por 15 minutos, em banho seco, para total evaporação da acetona. Quarenta microlitros de água *Milli-Q* estéril, RNase free, foram adicionados ao precipitado e, em seguida, procedida a incubação a 62°C por 15 minutos. Após centrifugação a 16.000 x g por 3 minutos, o sobrenadante contendo o dsRNA de rotavírus foi transferido para um novo tubo de 1,5mL e estocado a -70°C.

### **3.5. Análise por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)**

Para a eletroforese foi utilizada a técnica de Laemmli, modificada por Pereira *et al*, 1983. A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical utilizando sistema contínuo a partir de dois géis. No gel separador foi utilizada uma concentração constante de 7,5% de acrilamida, enquanto que no gel concentrador de 3,5% de acrilamida.

A corrida foi processada em tampão (Tris/ glicina pH 8.3) durante 1 hora e 45 minutos utilizando 25 mA. A coloração do gel foi feita pela impregnação por prata (Boulikas e Hancock, 1981).

### **3.6. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)**

Inicialmente, foi feita a desnaturação do dsRNA (5µL) a 97°C por 5 minutos, seguida da adição de 3µL de DMSO (dimetilsulfóxido). A reação foi incubada em banho de gelo por 5 minutos, para não reverter a desnaturação do RNA viral.

A reação de amplificação foi feita por RT-PCR, seguindo a descrição de Gouvea *et al*, 1990, utilizando-se os iniciadores 9con1 e 9con2 (Das *et al*, 1994), que amplificam um fragmento de 904pb do gene VP7 (Quadro 2). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 100 µL, contendo 5µL do RNA total extraído; 10 µL de tampão 10x (*Invitrogen*); 4 µL de cloreto de magnésio 50 mM (*Invitrogen*); 2,5 mM de cada dNTP

(*Gibco* BRL); 10  $\mu$ M de cada iniciador (9con1 e 9con2); 2.5U da enzima Taq polimerase (*Invitrogen*); e, 10U da enzima Transcriptase Reversa Super Script III (*Invitrogen*). Trinta ciclos de amplificação foram realizados no termociclador MJ Research PTC-100, utilizando a seguinte seqüência de ciclos 42°C por 60 minutos; 95°C por 5 minutos; 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 40°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos e um último ciclo a 72°C por 7 minutos.

Todas as amostras foram amplificadas na presença de controles negativos. Os produtos de PCR obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Todos os procedimentos para amplificação foram conduzidos em condições RNase free.

**Quadro 2.** Seqüências e posição do alinhamento dos iniciadores consensuais utilizados.

<b>Iniciadores</b>	<b>Seqüências</b>	<b>Posição</b>
9 con 1	TAGCTCCTTTTAATGTATGG	37-56
9 con 2	GTATAAAATACTTGCCACCA	922-941

### **3.7. Eletroforese**

Após cada reação de RT-PCR, 10 $\mu$ L dos produtos gerados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. O corante da amostra utilizado foi azul de bromofenol e o padrão de massa molecular foi de 123pb DNA (*Gibco* BRL). O tampão de corrida utilizado foi TRIS/EDTA 0,5x. Após a corrida, as amostras foram coradas com 1mg/mL de brometo de etídeo.

### **3.8. Precipitação**

Os produtos de PCR que apresentaram o tamanho esperado (904pb) foram precipitados pelo tratamento com acetato de amônio e etanol 100%, com a seguinte metodologia: foram adicionados, para cada volume do produto de PCR, meio volume de acetato de amônio 7,5M e 2,5 volumes de etanol 100%. A precipitação foi realizada a -80°C por 30 minutos e as amostras foram posteriormente submetidas à centrifugação a 13.000 rpm por 40 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 100 µL de etanol 70% e centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado mantido à temperatura de 37°C por 1 hora e, em seguida, foi homogeneizado em 15 µL de água *Milli-Q* estéril, RNase free.

### **3.9. Seqüenciamento automático**

Os produtos de PCR foram seqüenciados automaticamente, utilizando o iniciador 9con1 (senso) (Das *et al.*, 1994) para o seqüenciamento do gene da proteína VP7. O seqüenciamento foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, utilizando o kit “*Taq Dye-terminator*”, no sistema Megabace Molecular Dynamics (Amersham, Pharmacia) e na plataforma de seqüenciamento da EMBRAPA (Cenargen) utilizando o kit ABI PRISM® BigDye™ *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* versão 3.1 (*Applied Biosystems*).

### **3.10. Sorotipagem para a proteína VP7 (G)**

Foi avaliada a ocorrência dos sorotipos G1, G2, G3 e G4 pela técnica de ELISA, utilizando anticorpos monoclonais sorotipo específicos do kit Serotec/ Rota-MA da Serotec

Laboratory, Japan. Somente, as amostras do segundo período foram analisadas por essa técnica por Teixeira, JMS (dados não publicados).

### **3.11. Genotipagem G**

#### **3.11.1. Análise de homologia**

A qualidade das seqüências obtidas na reação de seqüenciamento automático foi verificada por PHRED (Ewing *et al*, 1998). A determinação do genótipo das amostras baseou-se na análise de homologia das seqüências nucleotídicas utilizando o programa BLAST ( *Basic local Alignment Search Tool*) ( Altschul *et al.*,1990) e FASTA (Pearson WR,1990) onde as mesmas são alinhadas com as seqüências virais disponíveis no banco genômico EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>).

#### **3.11.2. Análise filogenética**

As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando-se o programa PHYLIP (Felsenstein J, 1993). O alinhamento de múltiplas seqüências foi realizado pelo programa CLUSTAL W (Thompson *et al*, 1994) e editado por inspeção visual. A construção da árvore filogenética foi realizada pelo método de *neighbor-joining* (NJ), utilizando o modelo de distância dois parâmetros de Kimura (Kimura MA, 1980). A confiabilidade da árvore NJ foi avaliada pela análise de 1000 réplicas (*bootstrap*). Na formação da árvore filogenética, foram incluídas as seqüências do gene da proteína VP7 que geraram um fragmento de 300 pb das amostras do Distrito Federal e seqüências de diferentes genótipos de rotavírus do grupo A. Uma seqüência do genótipo G9 (WI61) de rotavírus do grupo A foi utilizada como grupo externo. As árvores foram desenhadas com o programa TreeView 1.4 (Page RDM, 1996).

Para construção da árvore filogenética foram utilizadas as seguintes seqüências de referência e seus respectivos números de acesso no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)): SA3958 (AY261344), SA356 (AY261342), SA4476 (AY261343), BF3676 (AY261355), GH1803 (AY261353), SA514 (AY261338), DS-1 (AB118023), WI61 (AB180969), 97CM113 (AY866505), R160 (AF274971), 5001DB/97 (AF529864), H8 (U41005), R291 (AY855064), MaCH09004 (AY900173), GR846 (AF161822), Arg928 (AF373918), TE56 (AF183856), B74-02 (AY635048), T73 (AF450291), RMC (AY603150), Hun4 (AJ487833), R353 (DQ122400), 94H109 (AB045375), T108 (AF450293), e 1054 (U41003).

### ***3.12. Análise estatística***

Os dados foram armazenados e analisados no programa Epi Info 6.0, o método estatístico empregado foi Qui-quadrado através dos módulos STATCALC e ANALYSIS do mesmo programa.

## 4. Resultados

### 4.1. Amostragem

Foram analisadas pelo Núcleo de Virologia do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal, Lacen-DF, 103 amostras fecais positivas de crianças de 0 a 5 anos, com quadro de diarreia aguda, atendidas nas emergências de várias unidades da rede pública de saúde do Distrito Federal.

Considerando o número total de casos positivos para rotavírus no primeiro período (1986 a 1990) e segundo período (1994 a 1996), foi observado uma frequência significativamente maior na faixa etária de  $> 6$  a  $= 12$  meses quando comparada a faixa etária de  $= 6$  ( $p = 0,007282$ ). Não houve diferença significativa entre as faixas de  $> 6$  a  $= 12$  meses e de  $> 12$  a  $= 24$  meses ( $p = 0,548708$ ). Também não foi observada diferença significativa entre as faixas etárias de  $= 6$  meses e  $> 24$  a  $= 60$  meses ( $p = 0,980664$ ). Entretanto, comparando-se as faixas de  $> 6$  a  $= 24$  meses com as demais (até 6 meses e maiores de 24 meses), foi possível observar uma positividade para rotavírus significativamente maior na faixa etária de  $> 6$  a  $= 24$  meses ( $p = 0,000062$ ) mostrando que as infecções por rotavirus são mais frequentes em crianças na faixa etária de  $> 6$  a  $= 24$  meses (Tabela 1).

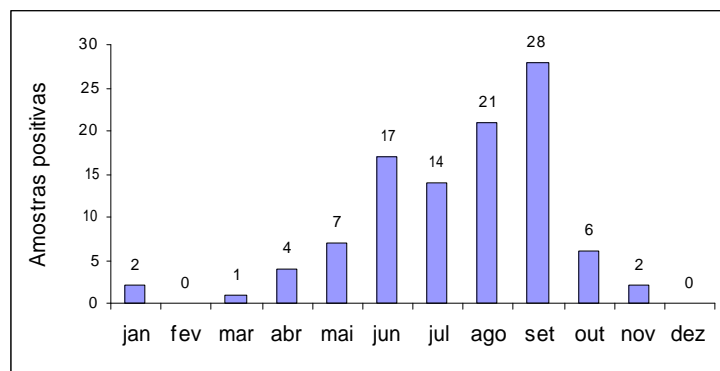
**Tabela 1.** Distribuição do número total de casos positivos para rotavírus nos períodos de 1986 a 1990 e 1994 a 1996 segundo a faixa etária.

Faixa etária (meses)	Positivo	Negativo	Total
$= 6$	11	349	360
$> 6$ a $= 12$	31	387	418
$> 12$ a $= 24$	28	297	325
$> 24$ a $= 60$	6	188	194
Sem dados	5	5	10
Total	81	1226	1307

Nota: Os dados referentes ao terceiro período (2004 e 2005) não foram incluídos, tendo em vista que não houve monitoramento sistemático de quadros de diarreia pela Rede Pública de Saúde do Distrito Federal nesse período.

#### 4.2. Sazonalidade

O Distrito Federal, com a superfície de 5.783 Km<sup>2</sup>, localizado no Estado de Goiás, é limitado pelas latitudes de 15° 30' / 16° 03' S e pelas longitudes de 47° 18' / 48° 17' W e encontra-se a uma altitude média de 1100m. Seu clima é Tropical de Savana Temperado, caracterizado basicamente por duas estações: uma seca, de maio a setembro que compreende o período de estiagem; e outra chuvosa, de novembro a março quando ocorre 92% da precipitação anual. Os meses de abril e outubro são caracterizados pela transição entre as estações chuvosa e seca (abril) e a seca e chuvosa (outubro). O período seco apresenta baixos índices de umidade relativa, com predominância de névoa seca produzida por partículas de poeira em suspensão, fumaças de queimadas e dióxido de carbono dos automóveis. A névoa seca chega a ficar mais intensa de agosto até setembro, quando os índices de umidade relativa do ar alcançam os valores críticos. (Brasil, 1986). Durante os três períodos estudados, os rotavírus só não foram detectados nos meses de fevereiro e dezembro, sendo que as maiores frequências foram registradas nos meses de agosto e setembro, os mais secos do ano (Gráfico 1).



**Gráfico 1** - Distribuição mensal das amostras positivas para rotavírus durante os três períodos estudados. A distribuição temporal das frequências de positividade para rotavírus foi realizada com base na data de coleta das amostras.

A frequência de casos positivos foi nitidamente mais elevada entre os meses de maio e setembro (85,30%), período de menor precipitação pluviométrica, quando comparado com o período chuvoso de novembro a março (4,9%) (Brasil, 1986) Tabela 2.

**Tabela 2** - Distribuição dos casos positivos para rotavírus A, segundo as estações do ano no Distrito Federal. Percentual relativo ao número total de amostras analisadas.

Estações	Número	%
Mês de transição (abril)	4	3,92
Estação seca (maio a setembro)	87	85,30
Período transição (outubro)	6	5,88
Estação chuvosa (novembro a março)	5	4,90
Total	102*	100,00

Fonte: Instituto Nacional de meteorologia.

\* Nota: Uma amostra não foi analisada quanto ao aspecto de sazonalidade, uma vez que a data de coleta não constava na ficha epidemiológica.

### **4.3. Detecção viral**

#### **4.3.1. Técnica de EIARA**

A detecção de rotavírus do grupo A nas amostras analisadas pelas técnicas EIARA e sorotipagem foi previamente realizada por Teixeira, J.M.S. (dados não publicados). Os dados obtidos por essas análises foram gentilmente cedidos ao nosso grupo de pesquisa em Virologia e comparados com os observados pela técnica PAGE. Do total de 103 amostras, 101 foram reagentes pela técnica de EIARA.

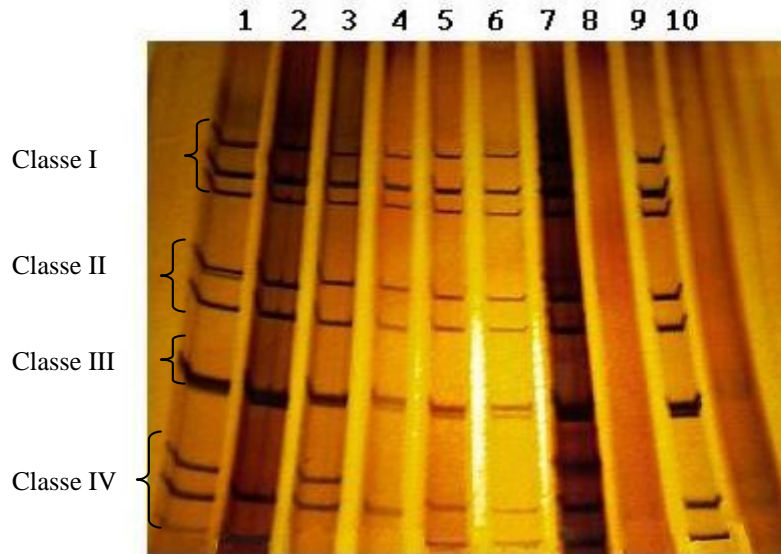


#### **4.3.2. Técnica de PAGE**

Para análise do PAGE, foram consideradas como apresentando infecção por rotavírus do grupo A as amostras com 11 segmentos de tamanhos correspondentes aos segmentos genômicos virais. Observa-se que os 11 segmentos de dsRNA dos rotavírus do grupo A migram sempre em quatro classes distintas de acordo com o peso molecular: Classe I (segmentos 1, 2, 3 e 4), Classe II (segmentos 5 e 6), Classe III (segmentos 7, 8 e 9) e Classe IV (segmentos 10 e 11). A migração dos segmentos 10 e 11, em particular, define os padrões longo e curto dos rotavírus (Lourenço *et al.*, 1981).

O perfil curto é caracterizado pela maior proximidade dos segmentos genômicos 10 e 11 (Classe IV) em relação aos segmentos da Classe III, enquanto no perfil longo esses segmentos encontram-se mais distantes. Na amostra caracterizada como perfil curto atípico, os segmentos 10 e 11 encontram-se sobrepostos na altura do segmento 11 do padrão eletroforético curto.

A Figura 10 mostra diferentes padrões de migração, perfil longo, curto e atípico, em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata.



**Figura 10** - Eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata, evidenciando diferentes perfis eletroforéticos. A coluna 1 contém uma mistura de RNA com perfis eletroforéticos longo e curto. As colunas 2, 5, 6, 7 e 9 apresentam amostras com perfil eletroforético longo; coluna 3, perfil eletroforético curto e coluna 4, perfil eletroforético curto atípico. As colunas 8 e 10 representam amostras negativas no teste PAGE.

Ao analisar o perfil eletroforético das 103 amostras correspondentes aos três períodos, foi observado que todas apresentaram resultado positivo em PAGE. Do total de 103 amostras, 94 (91,26%) apresentaram perfil longo, oito (8,51%) perfil curto e uma (0,97%) única amostra foi classificada como perfil curto atípico.

Das 94 amostras que apresentaram perfil longo, 32 (34,04%) eram do primeiro período, 40 (42,55%) do segundo período e 22 (23,40%) do terceiro período. Dentre as oito amostras que correspondiam ao perfil curto, duas (25%) eram do primeiro período e sete (75%) do segundo período. Uma amostra do segundo período foi classificada como perfil curto atípico. Na Tabela 03, estão representados os perfis eletroforéticos encontrados em cada período analisado.

**Tabela 3** - Frequência dos perfis eletroforéticos por período estudado. Análise da migração dos segmentos genômicos de rotavírus encontrados nos diferentes períodos e o percentual relativo ao total de amostras analisadas por período.

Perfil eletroforético	Período							
	Primeiro	%	Segundo	%	Terceiro	%	Total	%
Curto	2	5,88	7*	14,90	0	0	9	8,74
Longo	32	94,12	40	85,10	22	100,00	94	91,26
Total	34	100,00	47	100,00	22	100,00	103	100,00

(\*) – Uma amostra apresentou um padrão de migração eletroforética curto atípico.

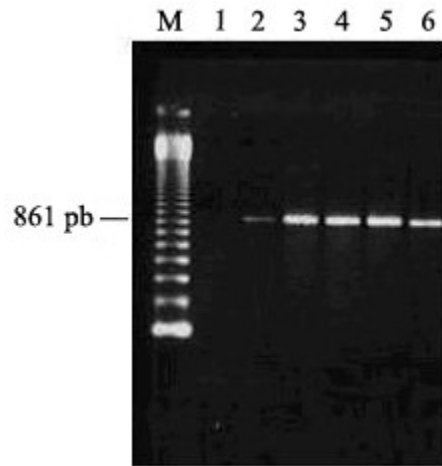
Quando foi efetuada a comparação entre as duas técnicas, EIARA e PAGE, foi possível observar que 101 amostras (98,05%) foram positivas nas duas metodologias. Duas amostras do primeiro período foram não reagentes pela técnica EIARA e positivas na técnica PAGE.

#### 4.3.3. *Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)*

Todas as 103 amostras foram transcritas reversamente e amplificadas para o gene da proteína VP7 com iniciadores consenso, obtendo-se um fragmento esperado de 904pb. Esse resultado confirmou a infecção por rotavírus do grupo A nas amostras analisadas.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo para avaliar a qualidade do cDNA amplificado. Nenhuma das amostras apresentou bandas inespecíficas, mostrando a especificidade dos iniciadores

utilizados. Em todo procedimento foi incluído o controle negativo para monitorar possíveis contaminações (Figura 11).



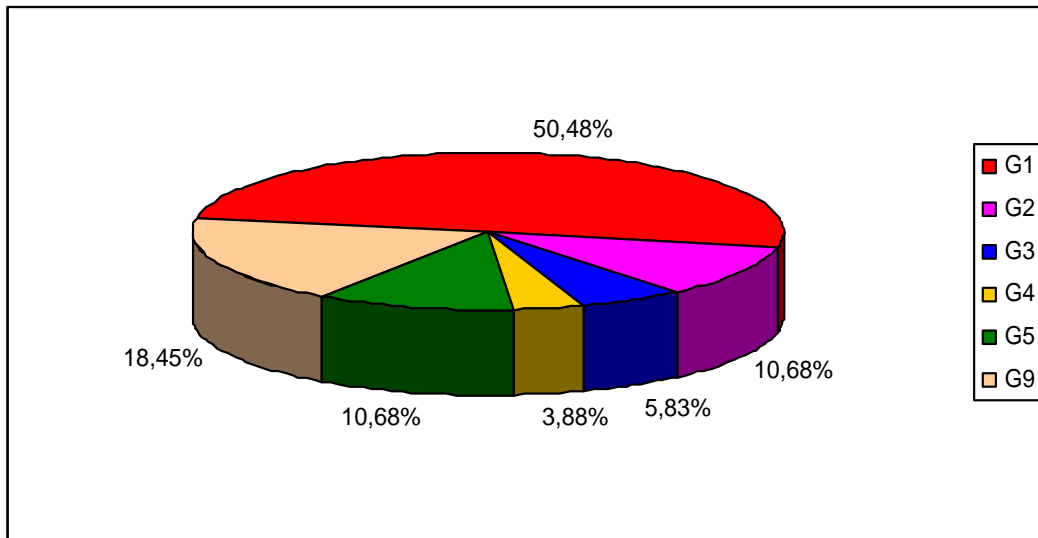
**Figura 11** - Análise eletroforética dos produtos de PCR em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A letra M indica o marcador de massa molecular 123 pb, o número 1 indica o controle negativo e os números de 2 a 6 representam os fragmentos amplificados para gene VP7, mostrando o tamanho esperado de 904pb.

#### 4.4. Genotipagem G

A genotipagem do gene da VP7 foi realizada por meio da análise de homologia das seqüências de nucleotídeos geradas pelo seqüenciamento automático. Nesta análise, as seqüências obtidas foram alinhadas com as seqüências virais disponíveis nos bancos genômicos, utilizando-se os programas FASTA e BLAST (PearsonWR, 1990; Altschul *et al.*, 1990).

Os genótipos G detectados nas amostras coletadas em todos os três períodos analisados foram: genótipo G1 em 52 amostras (50,48%), genótipo G2 em 11 amostras (10,68%), genótipo G3 em seis amostras (5,83%), genótipo G4 em quatro amostras (3,88%), genótipo G5 em 11 amostras (10,68%) e genótipo G9 em 19 amostras (18,45%)

(Gráfico 2). Vale ressaltar que, até o presente trabalho, o genótipo G9 não havia sido identificado no Distrito Federal.

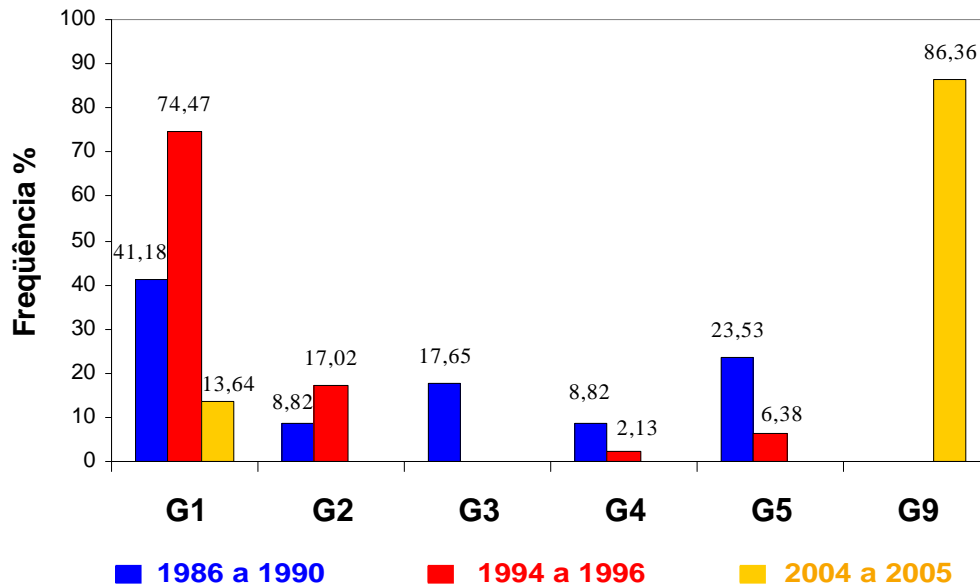


**Gráfico 2** - Frequência dos genótipos G encontrados nos três períodos estudados no Distrito Federal. Percentuais relativos ao total de amostras analisadas. A determinação dos genótipos G das amostras dos três períodos estudados foi baseada nas análises e homologia, realizada pelo programa FASTA e BLAST.

Das 34 amostras coletadas no primeiro período (1986 a 1990), foram identificadas 14 amostras do genótipo G1(41,18%), oito do genótipo G5 (23,53%), seis do genótipo G3 (17,65%), três do genótipo G2 (8,82%) e três do genótipo G4 (8,82%). Nesse período há uma grande diversidade genotípica, sendo o genótipo G1 o mais frequente, seguido do genótipo G5 (Gráfico 3, Gráfico 4 e Tabela 5).

Das 47 amostras coletadas no segundo período (1994 a 1996), 35 amostras apresentaram genótipo G1 (74,47%), oito do genótipo G2 (17,02%), três do genótipo G5 (6,38%) e uma amostra do genótipo G4 (2,13%). Nesse período, o genótipo G1 foi notoriamente o mais frequente (Gráfico 3, Gráfico 4 e Tabela 5).

Das 22 amostras seqüenciadas do terceiro período (2004 a 2005), 19 amostras foram caracterizadas como genótipos G9 (86,36%) e três como genótipo G1 (13,64%), seguido do genótipo G2 (17,02%) (Gráfico 3, Gráfico 4 e Tabela 4).



**Gráfico 3** - Genótipos G de rotavírus A detectados no Distrito Federal nos períodos de 1986 a 1990; 1994 a 1996 e 2004 a 2005

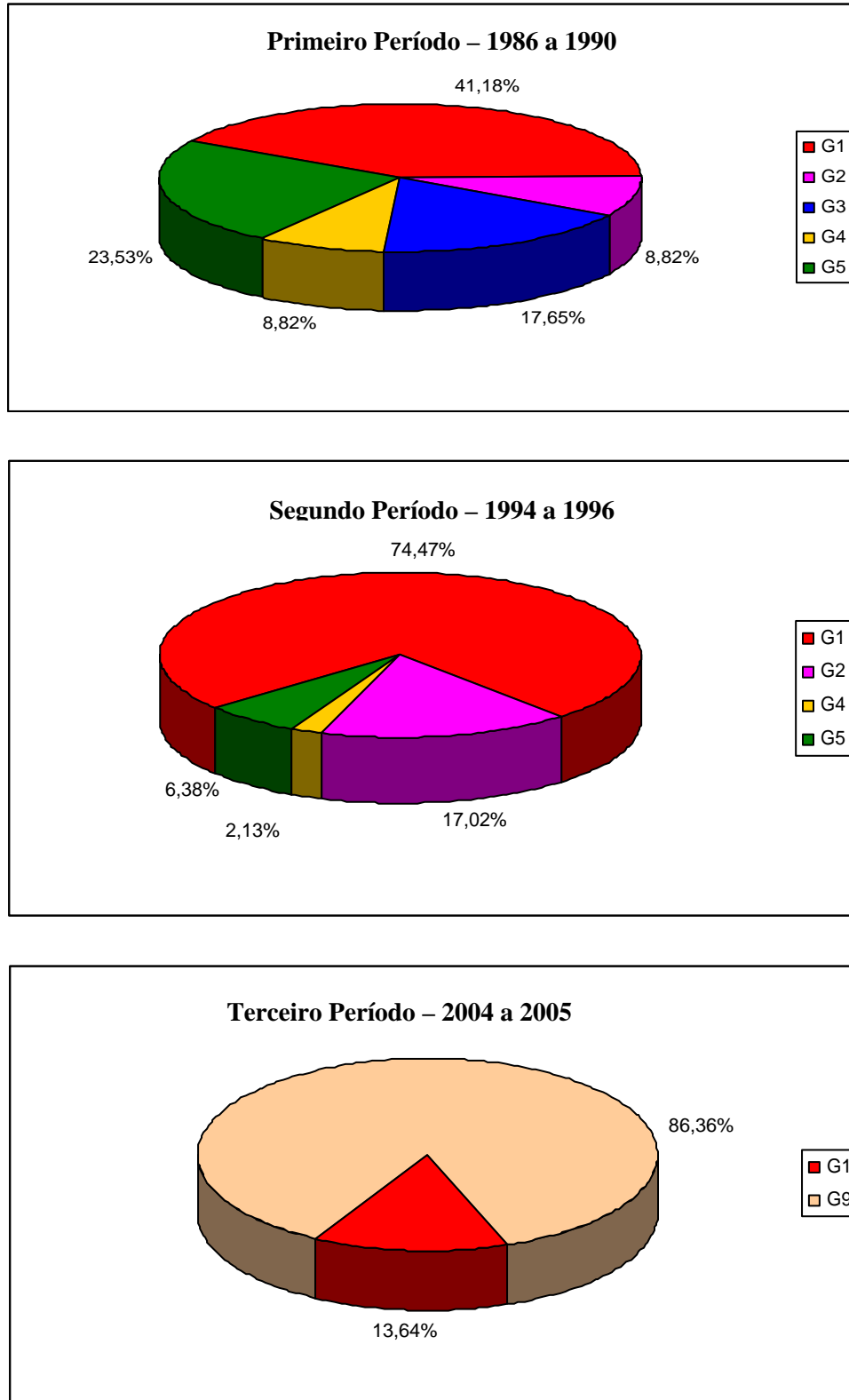


Gráfico 4 - Frequência dos genótipos G encontrados nos três períodos analisados.

**Tabela 4** - Frequência dos diferentes genótipos G encontrados nos três períodos estudados.

Genótipo G	Primeiro período		Segundo período		Terceiro período	
	Número	%	Número	%	Número	%
G1	14	41,18	35	74,47	3	13,64
G2	3	8,82	8	17,02	0	0
G3	6	17,65	0	0	0	0
G4	3	8,82	1	2,13	0	0
G5	8	23,53	3	6,38	0	0
G9	0	0	0	0	19	86,36
Total	34	100,00	47	100,00	22	100

Para cada período estudado, foi analisada a distribuição anual de cada genótipo G (Tabela 5). O genótipo G1 foi detectado em todos os anos e os demais genótipos apresentaram flutuações na ocorrência anual. Quando o genótipo G5 foi detectado, G9 não foi observado e no ano em que G9 foi encontrado, G5 não estava presente.

**Tabela 5** - Distribuição dos genótipos G por ano em cada período analisado.

	Genótipos G					
	G1	G2	G3	G4	G5	G9
<b>Primeiro Período</b>						
<b>1986</b>	2	1	0	0	4	0
<b>1987</b>	2	0	0	1	0	0
<b>1988</b>	2	0	2	0	0	0
<b>1989</b>	6	2	2	1	0	0
<b>1990</b>	1	0	2	1	4	0
<b>Segundo Período</b>						
<b>1994</b>	9	6	0	0	2	0
<b>1995</b>	25	2	0	1	1	0
<b>1996</b>	1	0	0	0	0	0
<b>Terceiro Período</b>						
<b>2004</b>	2	0	0	0	0	19
<b>2005</b>	1	0	0	0	0	0



#### **4.5. Sorotipagem para a proteína VP7 (G)**

Das 47 amostras do segundo período, 46 foram submetidas à sorotipagem. Dessas, 28 amostras (60,87%) tiveram o sorotipo definido em relação à proteína VP7 do capsídeo externo. Dezoito amostras (39,13%) não foram reconhecidas pelos anticorpos monoclonais utilizados – sorotipos G1, G2, G3 e G4, não permitindo a sorotipagem.

Das amostras sorotipadas, 27 corresponderam ao sorotipo G1 e uma ao sorotipo G2. Do total de 35 amostras genotipadas como G1, 26 (74,3%) foram do sorotipo G1, evidenciando a concordância entre as duas metodologias para essas amostras. Oito amostras do genótipo G1 foram não reagentes. Em relação ao genótipo G2, do total de oito amostras, apenas uma foi caracterizada como do sorotipo G2. A amostra caracterizada como G4 não foi detectada por sorotipagem.

A impossibilidade de definição de alguns sorotipos por essa metodologia, pode ter ocorrido por causa de sucessivos congelamentos e descongelamentos das amostras. Ressalta-se também a presença entre elas de sorotipos não avaliados pela técnica empregada, o que pôde ser comprovado pelos resultados obtidos no presente estudo, pela técnica de seqüenciamento.

Todos os isolados do sorotipo G1 apresentaram perfil eletroforético longo e a amostra do sorotipo G2, perfil eletroforético curto. A amostra 262 foi sorotipada como G1, no entanto, por meio da análise da seqüência de nucleotídeos correspondeu ao genótipo G2 (Tabela 6).

**Tabela 6** - Frequência dos Genótipos G, sorotipos G e perfis eletroforéticos das amostras do segundo período. Percentual relativo ao número total de amostras analisadas período. O perfil eletroforético das amostras do segundo período foi obtido por meio da análise da migração dos segmentos genômicos do rotavírus, em gel de poliacrilamida. A sorotipagem G foi feita por ELISA utilizando anticorpos monoclonais específicos para proteína VP7, para os sorotipos G1 a G4. Os genótipos G foram determinados pela análise de homologia, realizada pelos programas FASTA e BLAST.

Genótipo G	Sorotipo G	Perfil elétoforético	Nº	%
G1	G1	Longo	26	55,31
	Não reagente	Longo	7	14,9
	Não reagente	Curto	1	2,13
G2	G2	Curto	1	2,13
	G1	Longo	1	2,13
	Não reagente	Curto (*)	5	10,64
	Não realizado	Longo	1	2,13
G4	Não reagente	Longo	1	2,13
G5	Não reagente	Longo	3	6,38

(\*) – Uma amostra apresentou um padrão de migração eletroforética curto atípico.

#### **4.6. Comparação entre Genótipo G e o Perfil Eletroforético**

Nas amostras do primeiro período, o genótipo G2 foi o único que apresentou perfis curto e longo, tendo uma amostra com padrão curto e duas amostras com padrão longo. Os demais genótipos desse período apresentaram perfil longo (Tabela 7).

**Tabela 7** - Perfis eletroforéticos e genótipos G detectados nas amostras do primeiro período. Percentual relativo ao total por genótipo G. A determinação do perfil eletroforético das amostras do primeiro período foi realizada em gel de poliacrilamida. Os genótipos G foram determinados pela análise de homologia.

Perfil eletroforético	Genótipo G					Total
	G1 (%)	G2 (%)	G3 (%)	G4 (%)	G5 (%)	
Longo	14 (100)	1 (33)	6 (100)	3 (100)	8 (100)	32
Curto	0 (0)	2 (67)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2
Total	14 (100)	3 (100)	6 (100)	3 (100)	8 (100)	34

As amostras do segundo período mostraram perfis longo, curto e curto atípico, associados aos genótipos G1 e G2. Das 35 amostras do genótipo G1, 34 apresentaram perfil longo (97,14%) e uma com perfil curto (2,86%). Das oito amostras do genótipo G2, duas (25%) corresponderam ao perfil longo, cinco (62,5%) ao perfil curto e uma apresentou um perfil curto atípico (12,5%) (Tabela 8).

**Tabela 8** - Perfis eletroforéticos e genótipos G detectados nas amostras do segundo período. Percentual relativo ao total por genótipo. A determinação do perfil eletroforético foi realizada por meio da análise da migração dos segmentos genômicos viral, em gel de poliacrilamida. Os genótipos G foram determinados pela análise de homologia.

Perfil eletroforético	Genótipos G				Total
	G1 (%)	G2 (%)	G4 (%)	G5 (%)	
Longo	34 (97,14)	2 (25,00)	1 (100,00)	3 (100,00)	40
Curto	1 (2,86)	6* (75,00)	0	0	7
Total	35 (100,00)	8 (100,00)	1 (100,00)	3 (100,00)	47

(\*) Uma amostra apresentou um padrão de migração eletroforética curto atípico.

O perfil eletroforético longo foi detectado em todas as amostras do terceiro período, as quais corresponderam aos genótipos G1 e G9 (Tabela 9).

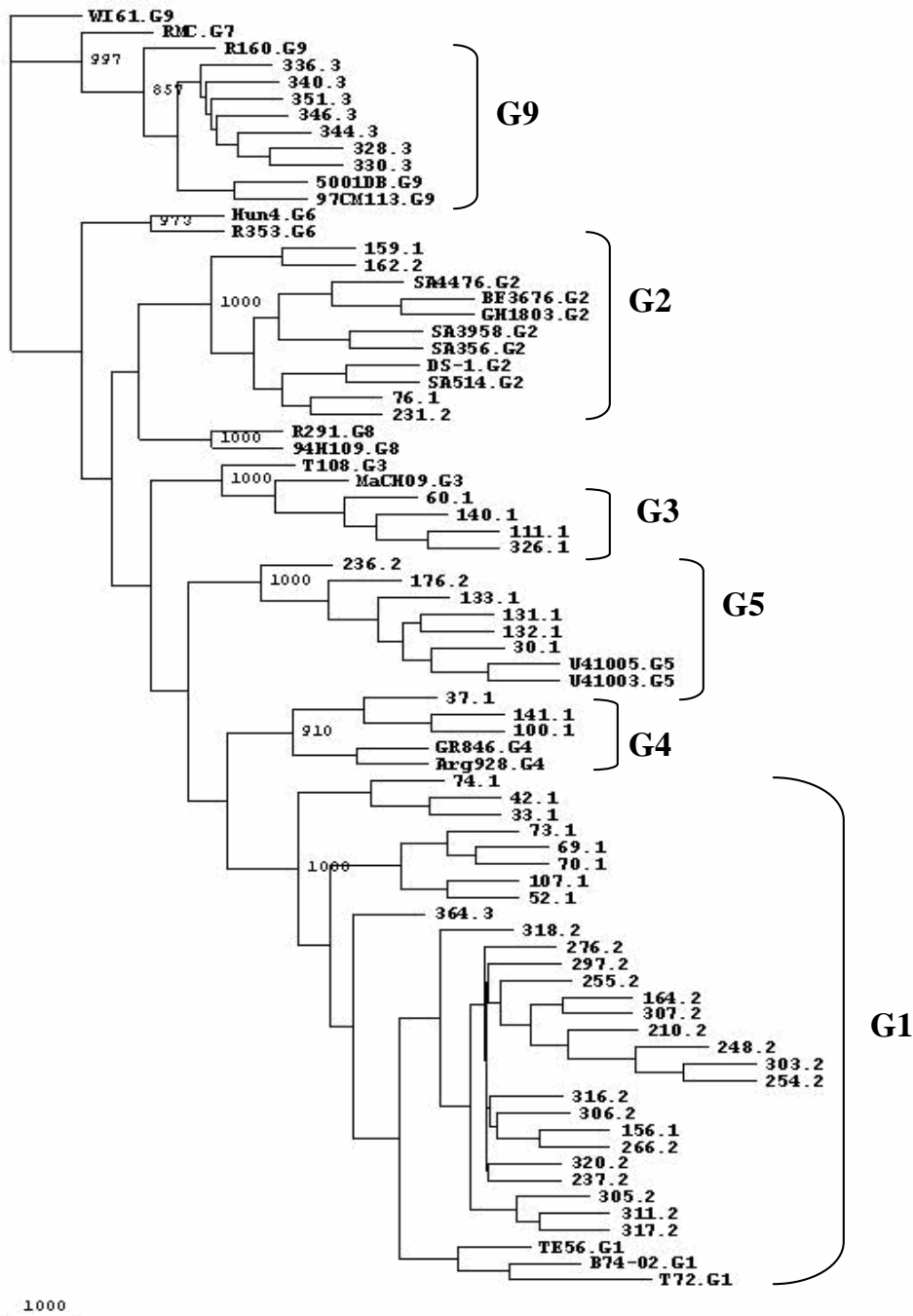
**Tabela 9** - Perfis eletroforéticos e genótipos G detectados nas amostras do terceiro período. Percentual relativo ao total por genótipo. A determinação do perfil eletroforético foi realizada por meio da análise da migração dos segmentos genômicos viral, em gel de poliacrilamida. Os genótipos G foram determinados pela análise de homologia.

Perfil eletroforético	Genótipo G		
	G1(%)	G9 (%)	Total
Longo	3 (100)	19 (100)	22
Curto	0 (0)	0 (0)	0
Total	3 (100)	19 (100)	22

#### 4.7. Análise Filogenética

A análise filogenética foi conduzida utilizando-se o método de *neighbor joining* por meio do conjunto de programas PHILIP (Felsenstein F, 1993), para as seqüências obtidas com no mínimo 300pb para o gene da proteína VP7. Desse modo, das 103 amostras seqüenciadas, 51 amostras foram utilizadas para o estudo de filogenia (Figura 12). A reprodutibilidade de cada ramo foi calculada pelo valor de *bootstrap* de 1000 replicações. O valor de *bootstrap* confiável foi estabelecido acima de 70% (Hillis e Bull, 1993).

A análise filogenética mostrou que 27 amostras agruparam com isolados do genótipo G1 (52 %), sete com isolados do genótipo G9 (13,7 %), seis com isolados do genótipo G5 (12,8 %), quatro com isolados do genótipo G2 (7,8 %), quatro com isolados do genótipo G3 (7,8 %) e três com isolados do genótipo G4 (5,9 %). Esses resultados estão de acordo com obtido pela análise de homologia realizada pelos programas FASTA e BLAST. Os valores de *bootstrap* na entrada dos ramos que definem cada genótipo estão descritos na Figura 12. Todos apresentaram valor acima de 70%, dando respaldo estatístico aos ramos.



**Figura 12** - Análise filogenética, realizada pelo método de *neighbor-joining*, das seqüências nucleotídicas de VP7, comparadas as seqüências de referência do rotavírus. As amostras analisadas aparecem indicadas pelo número do isolado seguido pelo período em que foram coletadas. Já as seqüências utilizadas como referência aparecem indicadas pelo nome do isolado seguido pelo genótipo. Os números mostrados nos pontos de ramificação representam os valores de *bootstrap* para 1000 réplicas.

## 5. Discussão

Em 1991, Teixeira *et al.*, descreveram pela primeira vez a ocorrência de rotavírus do grupo A associados a diarreias agudas infecciosas no Distrito Federal. Nesse trabalho, foi relatada uma prevalência de rotavírus de 20,27 % num total de 607 amostras provenientes de crianças na faixa etária de 0 a 6 anos.

As infecções por rotavírus podem ocorrer em crianças desde o nascimento até idades mais avançadas (Bishop RF, 1996). No presente trabalho foi possível observar uma positividade significativamente maior em crianças com idades entre 6 e 24 meses quando comparada com as demais faixas etárias estudadas ( $p = 0,000062$ ) evidenciando que as infecções por rotavírus são mais frequentes entre 6 e 24 meses de idade. Este dado é concordante com Soenarto *et al* (1981), Pereira *et al* (1993). Em um estudo pioneiro realizado no Distrito Federal entre 1986 e 1990 por Teixeira *et al.* (1991), foram analisadas 123 amostras fecais de crianças com até 6 anos de idade, positivas para rotavírus. A distribuição desses casos por faixa etária, também revelou uma maior frequência (73,98%) de infecções por rotavirus entre 6 a 24 meses de idade.

Em um estudo realizado na Argentina, entre 1996 a 1998, foi possível observar a maior prevalência de infecções por rotavírus em crianças até 12 meses (62%), que diminuiu para 21% em crianças menores de 6 meses (Bok *et al.*, 2001). Yoshinaga *et al.*, (2006) observou que maior incidência de gastroenterites por rotavírus no Japão encontra-se em crianças com idade entre 12 e 23 meses (39,9%) e menor na faixa etária de 6 meses (5,2%).

A amamentação, a presença de anticorpos séricos adquiridos passivamente da mãe (Konno *et al.*, 1978) e fatores fisiológicos (Doan *et al.*, 2003) podem estar relacionados com a menor frequência de infecções por rotavírus na faixa etária de 0-6

meses de idade. Além disso, neonatos possuem quantidades inferiores de proteases intestinais, responsáveis por facilitar a entrada do rotavírus nas células alvos, dificultando a infecção (Raebel *et al.*, 1999). Yolken *et al.* (1992) documentaram que componentes não imunoglobulínicos presentes no leite humano impedem a replicação do rotavírus *in vitro* e podem também prevenir o desenvolvimento de gastroenterite, por esse agente, em animais experimentais. Anticorpos anti-rotavírus começam a aparecer em baixos níveis aos 7 meses e só atingem títulos elevados por volta dos 34 meses de idade (Linhares *et al.*, 1989). Tal fato poderia estar relacionado com a menor suscetibilidade de crianças mais velhas às infecções por rotavírus.

### **5.1.Sazonalidade**

Em regiões com clima temperado as infecções por rotavírus demonstram estar predominantemente associadas às temperaturas mais frias e com atmosfera mais seca (Bos *et al.*, 1995), podendo ocorrer surtos ocasionais no verão (Mrukowicz *et al.*, 1999). Em áreas tropicais o rotavírus ocorre em todo o ano e com uma menor variação sazonal (Doan *et al.*, 2003 e Cook *et al.*, 1990).

No Brasil, a distribuição sazonal das infecções por rotavírus assume duas configurações bem definidas. As regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul apresentam um perfil sazonal marcante, com maior incidência de casos nos meses mais secos do ano. Entretanto, o mesmo não acontece nas regiões Norte e Nordeste, onde as infecções ocorrem durante o ano todo (Linhares AC, 2000).

Os dados sobre sazonalidade obtidos neste estudo concordaram com os resultados obtidos em um estudo realizado no ano de 1986 por Teixeira *et al.* (1991) no Distrito Federal. Goiânia, cujo clima é muito semelhante ao do Distrito Federal, também apresenta

o mesmo padrão de sazonalidade (Cardoso *et al.*, 2003). Zária, cidade da Nigéria situada ao norte do país, no hemisfério norte, possui o mesmo clima do Distrito Federal (Tropical de Savana) e apresenta o mesmo padrão de distribuição anual de diarreia por rotavírus, com picos nos meses mais secos (Gomwalk *et al.*, 1993).

Países situados próximos ao equador, entre as latitudes 0° e 10° Norte e Sul, geralmente não apresentam uma sazonalidade definida ao longo do ano em relação às infecções por rotavírus. Por outro lado, países tropicais situados mais distantes da linha do equador (entre 10° e 23°27') tanto ao Norte como ao Sul apresentam picos sazonais em determinados meses do ano (Cook *et al.*, 1990). Os resultados obtidos no presente trabalho são concordantes com esses dados, uma vez que o Distrito Federal situa-se entre as latitudes 15° 30' / 16° 03' sul e caracteriza-se por apresentar um padrão de distribuição nitidamente sazonal.

Alguns fatores podem estar relacionados com o ciclo sazonal das doenças infecciosas. Correlações estatisticamente significantes entre ciclos epidêmicos e variação de temperatura, umidade, chuvas ou ventos tem sido identificados (Dowell SF, 2001).

Uma possibilidade para a manutenção do rotavírus de um inverno para outro é que adultos minimamente sintomáticos possam servir de hospedeiro permitindo a persistência viral na população em zonas temperadas. Também é possível que portadores assintomáticos possam existir. Nesses casos a quantidade do vírus nas fezes é baixa o suficiente para não permitir sua detecção. O rotavírus também pode persistir no ambiente em reservatórios não humanos (Hieber *et al.*, 1978). Gouvea *et al.* (1990) reforçam a idéia de que as infecções pelo rotavírus, tanto sintomáticas como assintomáticas, comuns em crianças mais velhas e



adultos, constituem um provável fator importante para a manutenção do vírus e transmissão em outros períodos.

### ***52. Métodos de detecção dos rotavírus***

Quando as técnicas de PAGE e EIARA foram utilizadas para detecção de rotavírus nas amostras analisadas neste estudo, observou-se uma concordância de 98,05% entre elas. Duas amostras foram não reagentes pela técnica de EIARA e positivas em PAGE. Resultados similares foram obtidos por Pereira *et al.*, (1983), que detectou uma concordância de 98,8% entre os ensaios de PAGE, EIARA e imunomicroscopia eletrônica. A concordância entre essas técnicas também foi relatada por Teixeira *et al.*, 1991 em estudo realizado no Distrito Federal, no qual foram analisadas 607 amostras fecais de crianças. Nesse trabalho, observou-se que 99% das amostras analisadas pelas duas técnicas apresentaram resultados concordantes.

Os perfis eletroforéticos observados também foram concordantes com aqueles descritos na literatura para os 11 segmentos do genoma dos rotavírus. Os 11 segmentos migraram sempre em quatro grupos distintos, apresentando padrão longo, curto ou curto atípico (Matsui *et al.*, 1990; Gentsch *et al.*, 2005).

A técnica de PAGE permite ainda a detecção de rotavírus de outros grupos. Em 1998, Teixeira *et al.*, demonstraram a detecção de rotavírus do grupo C em amostras do ano de 1994 no Distrito Federal por meio dessa técnica e da confirmação por PCR e hibridação molecular.

### 5.3. Genotipagem G

O conhecimento da distribuição temporal e geográfica dos genótipos de rotavírus é considerada crítica para o desenvolvimento e a implementação das vacinas contra esses agentes (Santos e Hoshino, 2005). Como discutido anteriormente, é possível observar uma grande diversidade de genótipos G e P circulando em diferentes regiões geográficas. Quando se leva em consideração a distribuição mundial de genótipos, pode-se verificar que as associações G1P[8], G2P[4], G3P[8] e G4P[8] são as mais prevalentes. Portanto, em relação aos genótipos G, os mais prevalentes mundialmente são os G1, G2, G3 e G4 (Santos e Hoshino, 2005).

O genótipo G1 é considerado o mais prevalente nos cinco continentes, ocorrendo em mais de 60% das infecções por rotavírus (Gentsch *et al.*, 1996; Santos e Hoshino, 2005). Estudos realizados tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento mostraram a ocorrência elevada do genótipo G1 (Frühwirth *et al.*, 2000, Kuruzöl *et al.*, 2003 e Urbina *et al.*, 2004).

A prevalência elevada de G1 no Brasil também tem sido reportada. Em um estudo conduzido por Pereira *et al.*, (1994), que abrangeu a maioria dos estados brasileiros, o sorotipo G1 foi o mais freqüente, seguido de G2. Leite *et al.* (1996), em um estudo realizado com amostras de nove estados brasileiros e no Distrito Federal verificou que, entre os anos de 1982 a 1994, G1 era o genótipo mais prevalente. Santos *et al.*, verificou que entre 1996 e 1999, G1 foi também o genótipo mais prevalente no Rio de Janeiro (Santos *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2003). Em Belém, Mascarenhas *et al.* (2002), relataram G1 como o mais prevalente. Em Minas Gerais, entre 1998 e 1999, o genótipo G1 foi o segundo mais prevalente (Rosa e Silva *et al.*, 2002). Timenetsky *et al.* (1994), analisou

amostras de São Paulo do período de 1986 a 1992, detectando o genótipo G1 como o mais prevalente nessa região geográfica. Em Goiânia, entre março de 1986 e junho de 1995, o genótipo G1 foi o mais prevalente entre as amostras genotipadas, ocorrendo em 21,6% dos casos (Cardoso *et al.*, 2001). Linhares AC (2000), aponta uma tendência ao predomínio de G1 sobre o G2 em casos de internações por diarreia, no Brasil. O predomínio de G1 também foi observado em Goiânia, nos anos de 2000 a 2003, ocorrendo em aproximadamente 78% das amostras (Souza *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2004).

Em nosso estudo, o genótipo G1 também foi o mais prevalente, sendo observado em 50,48% das amostras, quando os três períodos foram analisados conjuntamente. No primeiro período, entre 1986 e 1990, a prevalência de G1 foi de 41,18%. No segundo período, entre 1994 e 1996, G1 também foi o genótipo mais prevalente, correspondendo a 74,47% das amostras analisadas. Esses dados concordam com os demais estudos mundiais e brasileiros descritos anteriormente, que apontam elevada prevalência desse genótipo.

Os genótipos G2, G3 e G4 são relatados também como apresentando elevada prevalência no mundo. Esses três genótipos, associados ao G1 respondem por 89% das infecções por rotavírus na América Latina (Santos e Hoshino, 2005). No Brasil, Leite *et al.*, (1996) também relataram a ocorrência elevada desses genótipos, representando mais de dois terços do perfil de genótipos analisados.

No nosso estudo, os genótipos G2 G3 e G4 foram detectados em 10,68%, 5,83% e 3,88% das amostras, respectivamente. O genótipo G3 foi o terceiro mais prevalente no primeiro período (1986-1990). Entretanto, não foi detectado nos outros dois períodos. G4 e G2 foram detectados no primeiro e no segundo período. Em resumo, os genótipos G1, G2, G3 e G4 foram responsáveis por 70, 87% das infecções causadas por rotavírus no nosso estudo. Esse dado concorda com aquele obtido por Leite *et al.*, (1996).

Das onze amostras de genótipo G2 detectadas no nosso estudo, oito apresentaram perfil eletroforético considerado curto e 3 perfil longo. Dentre as 52 amostras de genótipo G1, foi detectada apenas uma com perfil eletroforético curto. O perfil curto costuma ser associado ao genótipo G2 (Timenetsky *et al.*, 1994). Nossos dados concordam com a literatura, pois o perfil curto foi associado mais frequentemente ao genótipo G2. Todos os demais genótipos da nossa amostragem apresentaram perfil longo em PAGE.

Em 1994, Gouvea *et al.*, demonstraram pela primeira vez a ocorrência de rotavírus do genótipo G5 em amostras de crianças com diarreia aguda, evidenciando que esse genótipo circulava no Brasil desde 1983. O G5 é um genótipo frequentemente encontrado em suínos e também já foi identificado em equinos (Santos e Hoshino, 2005). A ampla circulação de G5 no Brasil foi posteriormente comprovada por outros autores em vários estados brasileiros, a saber: Rio de Janeiro, São Paulo, Pará, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Paraná, Goiás e no Distrito Federal (Leite *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 1998; Mascarenhas *et al.*, 2002). Nos estudos já realizados, as amostras identificadas como pertencentes ao genótipo G5 apresentavam perfil longo (Gouvea *et al.*, 1994). A ocorrência de G5 também foi relatada no Paraguai e na Argentina (Bok *et al.*, 2001; Coluchi *et al.*, 2002). Recentemente, foi relatada a ocorrência de G5 na República de Camarões em amostras de crianças com diarreia aguda. Esse é o primeiro relato da ocorrência de G5 fora da América do Sul. Esse isolado mostrou mais homologia com rotavírus de suíno do que com amostras isoladas de humanos, evidenciando a ocorrência de trocas de segmentos genômicos (*reassortment*) entre linhagens animais e humanas de G5 (Esona *et al.*, 2004). Essas informações sugerem a ocorrência da transmissão interespecie de rotavírus de animais domésticos para humanos em condições naturais.

Neste estudo, o genótipo G5 foi detectado em 10,68% das amostras analisadas nos três períodos. Todas as amostras G5 apresentaram perfil longo em PAGE, concordando com os achados de Gouvea *et al.*, (1994). No primeiro período (1986 – 1990), a prevalência de G5 foi de 23,53%, sendo esse o segundo genótipo mais prevalente no período. No segundo período (1994-1996), a prevalência foi de 6,38%, sendo o terceiro mais prevalente. G5 não foi detectado no terceiro período (2004-2005). Esses dados concordam com aqueles descritos por Carmona *et al.* (2004), demonstrando que no Distrito Federal, o genótipo G5 tem apresentado uma diminuição na incidência. A literatura descreve que há indícios de diminuição da incidência de G5 no Brasil, dando lugar à emergência do genótipo G9 (Santos *et al.*, 2003; Carmona *et al.*, 2004).

O genótipo G9 foi inicialmente identificado em amostras fecais de crianças com infecção por rotavírus na Filadélfia (EUA), no período de 1983 e 1984, com uma prevalência de aproximadamente 9% (Clark *et al.*, 1987). Depois dessa detecção, o G9 desapareceu por aproximadamente duas décadas, mas reemergiu na metade da década de 1990. Em 1997, G9 foi detectado no Brasil (Araújo *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2003). Atualmente, o genótipo G9 é considerado mundialmente como o quarto mais prevalente, já tendo sido detectado no Paraguai, Argentina, em diversos países asiáticos, na África, Europa, Austrália (Arista *et al.*, 2004; Santos e Hoshino, 2005; Santos *et al.*, 2005).

Um estudo realizado no Rio de Janeiro em crianças menores de cinco anos com quadro de diarreia aguda coletada entre março de 1997 e dezembro de 1999 na cidade do Rio de Janeiro e Niterói identificou somente uma amostra caracterizada como G9 em 1997, que aumentou abruptamente para 25% (9/36) em 1998 e 27,7% (15/54) em 1999. Como descrito anteriormente, a diminuição da frequência do G5 coincide com emergência do G9 no Brasil. (Santos *et al.*, 2003).

A predominância do G9 também foi observada em estudo conduzido por Santos *et al.*, (2005) em Salvador, na Bahia, em três anos de estudo: 1999, 2000 e 2002. Nos três anos analisados, o genótipo G9 foi o mais prevalente, sendo relatado em 78,8% das amostras.

Em Goiânia, Souza *et al.*, (2003) relataram em 1998 e 2000 a ocorrência de G9 como o terceiro genótipo mais prevalente. Em amostras de julho de 2000 a 2002, G9 foi o segundo mais prevalente, ocorrendo em 34% das amostras (Costa *et al.*, 2004).

No presente trabalho, o genótipo G9 foi detectado apenas no terceiro período (2004-2005), sendo o mais prevalente nessa amostragem. A prevalência de G9 foi de 86,36%. Todas as amostras G9 apresentaram perfil longo em PAGE. Esses dados concordam com aqueles descritos previamente, que relatam uma elevada ocorrência de G9 em estudos mais recentes conduzidos no Brasil.

Os dados de filogenia apresentados na árvore foram gerados para 51 amostras das 103 analisadas no nosso estudo. Foi possível confirmar que a análise de homologia das seqüências foi concordante com a análise filogenética para todas essas amostras. A divisão dos ramos apresentou altos valores de *bootstrap*, respaldando os dados obtidos para a separação dos genótipos identificados nas amostras do estudo ora apresentado.

A importância da proteção sorotipo específica na doença causada por rotavírus ainda é tema de discussão. Várias vacinas candidatas são desenvolvidas com o intuito de fornecer uma proteção antigênica para todos os genótipos G e P detectados mundialmente entre seres humanos. Considerando que o genótipo G9 é como emergente e já é relatado como o quarto mais prevalente no mundo, vários autores sugerem a inclusão desse genótipo nos futuros modelos vacinais (Parra *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005).

O monitoramento do impacto das duas vacinas, em fase de implantação em vários países, é fundamental para que se possa avaliar a eficácia dessas na proteção cruzada em relação aos diferentes sorotipos de rotavírus.

## 6. Conclusões

- ✓ Das 103 amostras analisadas, 94 (91,26%) apresentaram perfil longo, 8 amostras (8,51%) perfil curto e uma amostra perfil curto atípico. Todas as amostras analisadas apresentaram perfil característico dos rotavírus do grupo A, com onze segmentos distribuídos em quatro classes distintas: classe I – quatro segmentos; classe II – dois segmentos; classe III – três segmentos; e classe IV – dois segmentos.
  
- ✓ Quando os dados dos três períodos foram analisados conjuntamente, o genótipo predominante foi o G1 (50,48%), seguido pelos genótipos G9 (18,45%), G2 (10,68%), G5 (10,68%), G3 (5,83%) e G4 (3,88%).
  
- ✓ No primeiro período (1986-1990) foram analisadas 34 amostras. Dessas, 41,18% corresponderam ao genótipo G1, 23,53% ao genótipo G5, 17,65% ao genótipo G3, 8,82% dos genótipos G2 e G4. No segundo período (1994-1996) foram analisadas 47 amostras. Desse total, 74,47% foram do genótipo G1, 17,02% G2, 6,38% G5 e 2,13% do genótipo G4. No terceiro período (2004-2005) foram caracterizadas 22 amostras. O genótipo mais prevalente foi o G9 (86,36%), seguido do G1 em 13,64% das amostras.
  
- ✓ Todos os dados obtidos estão de acordo com aqueles relatados na literatura, que apontam o genótipo G1 como o mais prevalente no mundo e no Brasil e o G9 como emergente.



- ✓ A separação dos ramos em genótipos apresentou valores de *bootstrap* elevados, confirmando os dados de homologia obtidos por meio dos programas FASTA e BLAST.
  
- ✓ As informações geradas por este trabalho poderão subsidiar estudos futuros de eficácia da vacina que está em fase de implantação no Brasil, bem como o monitoramento dos genótipos de rotavírus circulantes no Distrito Federal e Entorno.

## 7. Perspectivas

Este trabalho representou uma iniciativa conjunta da Universidade de Brasília e do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal, no sentido de implantar em nossa região a detecção e a caracterização molecular dos rotavírus humanos.

Nossos objetivos precípuos são contribuir para o desenvolvimento científico e para a melhoria da qualidade de vida da população do Distrito Federal. Com vistas a atender a esses anseios, pretendemos dar continuidade às atividades de pesquisa com os rotavírus humanos, envolvendo a colaboração entre essas Instituições, por meio das seguintes abordagens:

- 1 – Caracterização os genótipos P das amostras analisadas neste estudo por meio de PCR e seqüenciamento automático;
- 2 – Análise da diversidade genética dos genótipos G5 e G9 identificados neste trabalho.
- 3 – Monitoramento contínuo dos genótipos de rotavírus no Distrito Federal e Entorno.

## 8. Referências Bibliográficas

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers WE, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215(3):403-10.

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

Arias CF, Dector MA, Segovia L, López T, Camacho M, Isa P, et al. RNA silencing of rotavirus gene expression. *Virus Res.* 2004;102:43-51.

Arista S, Giammanco GM, DeGrazia S, Migliore MC, Martella V, Cascio A. Molecular characterization of genotype G9 human rotavirus strain recovered in Palermo, Italy, during the winter of 1999-2000. *Epidemiol. Infect.* 2004;132:343-9.

Bishop RF. Natural history of human rotavirus infection. *Arch. Virol.* 1996;12 Suppl: 119-28.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *The Lancet.* 1973;2(841):1281-3.

Black RE, Merson MH, Rahman ASMM, Yunus M, Alim ARMA, Huq I, et al. A two-year of bacterial, viral and parasitic agents associated with diarrhea in rural Bangladesh. *J. Infect. Dis.* 1980;142(5):660-4.

Bok K, Castagnaro N, Borsa A, Nates S, Espul C, Fay O, et al. Surveillance for rotavirus in Argentina. *J. Med. Virol.* 2001;65:190-8.

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Werthemvandillen PMF, VanDerNoordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990;28(3):495-503.

Bos P, Kirsten M, Cronje RE, Steele AD. Monitoring of rotavirus infection in a paediatric hospital by RNA electrophoresis. *S. Afr. Med. J.* 1995;85(9):887-91.

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

Brandt CDI, Arndt C, Evans G, Kim HW, Stallings EP, Rodriguez WJ, et al. Evaluation of a Latex Test for Rotavirus Detection. *J. Clin. Microbiol.* 1987;25:1800-2.

Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Thomas L, Yolken RH, Arrobio JO, et al. Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy, and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. *J. Clin. Microbiol.* 1981;12(5):976-81.

Brasil. Ministério da Saúde. Informe Técnico. Doenças Diarréica por Rotavirus: Vigilância Epidemiológica e Prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus. Brasília-Brasil. Março, 2006.

Brasil. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Instituto Nacional de Meteorologia. Manual de Observação de Superfície, 1986.

Bresee JS, Hummelman E, Neson EAA, Glass RI. Rotavirus in Asia: the value of surveillance for informing decisions about the introduction of new vaccines. *J. Infec. Dis.* 2005;192 Suppl 1:1-5.

Cardoso DDP, Soares CMA, Souza MBLD, Azevedo MSP, Martins RMB, Queiróz DAO, et al. Epidemiological features of rotavirus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2003;98(1):25-9.

Cardoso DDP, Rácz ML, Azevedo MSP, Martins RMB, Soares CMA. Genotyping of group A rotavirus samples from Brazilian children by probe hybridization. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2001;34:471-3.

Carmona RCC, Tmenetsky MCST, Silva FF, Granato CFH. Characterization of rotavirus strain from hospitalized and outpatient children with acute diarrhoea in São Paulo, Brasil. *J. Med. Virol.* 2004;74:166-72.

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

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

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

Conner ME, Ramig RF. Viral enteric diseases. In: Nathanson N, et al editors. *Viral Pathogenesis*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p.713-35.

Cook SM, Glass RI, LeBaron CH, Ho MS. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull. World Health Organ.* 1990;68:171-7.

Costa PSS, Cardoso DDP, Grisi SJFE, Silva PA, Fiaccadori F, Souza MBLD, et al. Infecções e reinfecções por Rotavirus A: genotipagem e implicações vacinais. *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80(2):119-22.

Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran, M, et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J. Clin. Microbiol*. 1994;32(7):1820-2.

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

Dennehy PH, Gauntlett DR, Tente WE. Comparison of nine commercial immunoassays for the detection of rotavirus in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol*. 1988; 26:1630-4.

Doan LTP, Okitsu S, Nishio O, Pham DT, Nguyen DH, Ushijima H. Epidemiological Features of Rotavirus Infection Among Hospitalized Children with Gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J. Med Virol*. 2003;69:588-94.

Dowell SF. Seasonal Variation in Host Susceptibility and Cycles of Certain Infectious Disease. *Emerg. Infect. Dis*. 2001; 7(3):1-8.

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

Estes MK. Rotavirus and their replication. In: Fields BN, Knipe PM, Howley PM, editors. *Fundamental Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. p.731-754.

Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 1989;53(4):410-49.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using PHRED I Accuracy assessment. *Genome Res.* 1998;8:175-85.

Felsenstein J. PHYLIP (Phylogenetic Interference Package) version 3.5c. [Distributed by the author]. Seattle: University of Washington, Department of Genetic; 1993.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Woode GN, Bridger JC, Derrick JM. Relation between viruses from acute gastroenterites of children and newborn calves. *Lancet.* 1974;2:61-3.

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

Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Bányai K, Ramachandran VJ, et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J. Infect. Dis.* 2005;192 Suppl 1:146-59.

Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A, et al. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J. Infect. Dis.* 1996;174 Suppl 1:30-6.

Gentsch JR, Glass RI, Woods PA, Gouvea V, Gorziglia M, Flers J, et al. Identification of group A gene 4 types by polymerases chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992;30(6):365-73.

Glass RI, Parashar UD. The promise of new rotavirus vaccines. *N. Engl. J. Med.* 2006;354(1):75-7.

Glass RI, Bresee JS, Turcios R, Fischer TK, Parashar UD, Steele AD. Rotavirus vaccines: targeting the developing world. *J. Infect. Dis.* 2005;192 Suppl 1:160-6.

Gomes TA, Rassi V, MacDonald KL, Ramos SRTS, Trabulsi LR, Vieira MA, et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal diseases in urban infants in São Paulo, Brazil. *J. Infect. Dis.* 1991;164:331-7.

Gomwalk NE, Umoh UJ, Gosham LT, Ahmad AA. Influence of climatic factors on rotavirus infection among children with acute gastroenteritis in Zaria, Northern Nigeria. *J. Trop. Pediatr.* 1993;39(5):293-7

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

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

Hieber JP, Shelton S, Nelson JD, Leon J, Mohs E. Comparison of human rotavirus disease in tropical and temperate settings. *Am. J. Dis. Child.* 1978;132:853-8.

Hillis DM, Bull, JJ. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 1993;42:182-92.

Kapikian AZ. Viral Gastroenterites. In: Evans AS, Kaslow RA, editors. *Viral infections of humans: epidemiology and control.* 4th ed. New York and London: Plenum Medical Book Company; 1997. p. 285-343.

Kimura MA Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotides sequence. *J. Mol. Evol.* 1980;16:111-120.



Konno T, Suzuki H, Imai A, Kutsuzawa T, Ishida N, Katsushima N, et al. A Long-Term Survey of Rotavirus Infection in Japanese Children with Acute Gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* 1978;38(5):569-75.

Kurugöl Z, Geylani S, Karaca Y, Umay F, Erensoy S, Vardar F, et al. Rotavirus gastroenteritis among children under five years of age in Izmir, Turkey. *Turk. J. Pediatr.* 2003;455:290-4.

Leite JPG, Alfieri AA, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR. Rotavirus G and P types circulating in Brasil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch. Virol.* 1996;141:2365-74.

Linhares AC. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. *Cad. Saúde Pública.* 2000;16(3):629-46.

Linhares AC, Bresee JS. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin América. *Pan Am. J. Pub. Health.* 2000;8(5):305-31.

Linhares AC, Melo VR, Mascarenhas JDP, Gabbay YB, Freitas R. B. Pattern of acquisition of rotavirus antibody in children followed up from birth to the age of three years. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1989;22(1):25-9.

Linhares AC, Monção HC, Gabbay YB, Araújo VLC, Serrya AC, Loureiro ECB. Acute diarrhoea associated with rotavirus among children living in Belém, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1983;77:384-90.

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

Linhares AC, Pinheiro FP, Schmetz C, Müller G, Peters D. Rotavírus em Belém do Pará, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 1977;19:278-9.

Lourenço MH, Nicolas LC, Cohen J, Scherrer R, Bricout F. Study of human rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. *Ann Inst. Pasteur (Paris).* 1981;132:161-73.

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

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

Matsui SM, Mackow ER, Matsuno S, Paul PS, Greenberg HB. Sequence analysis of gene 11 equivalents from “short” and “super short” strains of rotavirus. *J. Virol.* 1990;649(1):120-4.

Mrukowicz JZ, Krobicka B, Duplaga M, Kowalska-Duplaga K, Domański J, Kantecki M, et al. Epidemiology and impact of rotavirus diarrhoea in Poland. *Acta. Paediatr.* 1999;426 Suppl:53-60.

Page RDM. TREEVIEW: An application to display phylogenetics trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 1996;12:357-8.

Parra GI, Bok K, Martinez V, Russomando G, Gómez J. Molecular characterization and genetic variation of the VP7 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay. *J. Med. Virol.* 2005;77:579-86.

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

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

Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus. *Emerg. Infect. Dis.* 1998;4(4):561-70.

Pearson WR. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* 1990;183:63-98.

Pereira HG, Linhares AC, Candeias JAN, Glass RI. Vigilancia de los virus de la gastroenteritis en los laboratorios nacionales del Brasil. *Bull. Sanit. Pan Am.* 1994;116(1):27-36.

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

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

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG, Barth OM, Suttmoller F, Farias V, et al. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1983;78(4):483-90.

Raebel MA, Ou BS. Rotavirus disease and its prevention in infants and children. *Pharmacotherapy.* 1999;19(11):1279-95.

Ramachandan M, Das BK, Vij A, Kumar R, Bhambal SS, Kesari N, et al. Unusual diversity of human rotavirus G and P genotypes in India. *J. Clin. Microbiol.* 1996;34(2):436-9.

Raming RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J. Virol.* 2004;78(19):10213-20.

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

Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.* 2006;354(1):11-22.

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

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

Santos N, Soares CC, Volotão EM, Albuquerque MCM, Hoshino Y. Surveillance of rotavirus strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41(7):3399-3402.

Santos NOS. *Viroses Entéricas*. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. *Introdução à Virologia Humana*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A. 2002. p.59-74.

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

Soenarto Y, Sebodo T, Ridho R, Alrasjid H, Rohde JE, Bugg HC, et al. Acute diarrhea and rotavirus infection in newborn babies and children in Yogyakarta, Indonesia, from June 1978 to June 1979. *J. Clin. Microbiol.* 1981;14(2):123-9.

Souza MBL, Rácz ML, Leite JPG, Soares CMA, Martins RMB, Munford V, et al. Molecular and serological characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Goiânia, Brazil, 1998-2000. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2003;22:441-3.

Teixeira JMS, Câmara GNNL, Pimentel PFV, Ferreira MNR, Ferreira MSR, Alfieri AA, et al. Human group C rotavirus in children with diarrhea in the Federal District, Brasil. *Braz. J. Biol. Res.* 1998;31:1397-1403.

Teixeira JMS, DeFigueiredo RB, DosSantos HM, Ferreira MN, Câmara GN. Aspectos epidemiológicos das infecções por rotavírus no Distrito Federal, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1991;24:223-30.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(22):4673-80.

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

Timenetsky MCST, Kisielius JJ, Crisi E, Escobar AMU, Ueda M, Tanaka I. Rotavírus, adenovírus, astrovírus, calicivírus e “small round vírus particles” em fezes de crianças, com e sem diarreia aguda, no período de 1987 a 1988, na grande São Paulo. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 1993;35(3):275-80.

Tucker AW, Haddix AC, Bresee JS, Holman RC, Parashar UD, Glass RI. Cost-effectiveness analysis of rotavirus immunization program for the United States. *JAMA.* 1998;279(17):1371-6.

Urbina D, Rodríguez JG, Arzuza O, Parra E, Young G, Castro R, et al. G and P genotypes of rotavirus circulating among children with diarrhea in the Colombian northern coast. *Int. Microbiol.* 2004;2(7):113-20.

VanRegenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, et al. In: *Virus taxonomy. The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego: Academic Press; 2000. p. 395-433.

Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Damme PV, Santosham M, Rodriguez Z, et al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2006;354:23-33.

Volotão EM, Soares CC, Maranhão AG, Rocha LN, Hoshino Y, Santos N. Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro-Brazil during 2000-2004: detection of unusual strain with G8P[4] or G10P[9] specificities. *J. Med. Virol.* 2005;1-10.

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

Yoshinaga M, Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Yagyu F, Okitsu S, et al. Changing distribution of group A rotavirus G-types and genetic analysis of G9 circulating in Japan. Arch. Virol. 2006;151:183-92.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.