

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JOANA AMBROSINA DO CARMO

**ESTUDO PROSPECTIVO DE *ROTAVIRUS A* EM NEONATOS NA CIDADE DE
GOIÂNIA – GOIÁS**

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Divina das Dôres de Paula Cardoso

Dissertação de Mestrado

GOIÂNIA - GOIÁS

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JOANA AMBROSINA DO CARMO

**ESTUDO PROSPECTIVO DE *ROTAVIRUS A* EM NEONATOS NA CIDADE DE
GOIÂNIA - GOIÁS**

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Divina das Dôres de Paula Cardoso

Dissertação submetida ao Programa Multiinstitucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Convênio Rede Centro Oeste, Universidade de Brasília, Universidade Federal de Goiás Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde.

GOIÂNIA –GOIÁS

2006

DEDICATÓRIA

A meus pais João e Cesarina, exemplo de humildade e simplicidade e aos meus irmãos José, Tomaz, Benedito e Leocácia (*in memoriam*) pelo amor, dedicação e companheirismo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof^a. Dr^a. Divina das Dôres de Paula Cardoso, minha orientadora neste trabalho, pela amizade, companheirismo, dedicação e pelo permanente empenho em me proporcionar a chance de realizar um grande sonho.

AGRADECIMENTOS

“A **Deus**, pela vida e força para sustentar meu ânimo, e determinação para superar os obstáculos e continuar buscando pelos meus objetivos”.

Aos meus irmãos, Maria, Flausina e João Filho, por não medirem esforços para amenizar os desafios que a vida nos proporciona.

Aos sobrinhos, alegria, carinho e compreensão em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. Dr. Celmo Celso Porto coordenador do curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, cujo apoio me foi vital para o alcance dos objetivos.

À equipe do Laboratório de Virologia do IPTSP/UFG – professoras Ana Maria Tavares Borges, Fabíola Souza Fiaccadori, Megmar Aparecida dos Santos Carneiro e professor Rodrigo Alessandro Tôgo Santos – pela amizade, paciência, ensinamentos, convívio e colaboração neste trabalho.

Aos colegas da Pós-Graduação, em especial Enilza e Érika, pela agradável convivência e colaboração nos momentos difíceis.

Aos bolsistas e estagiários do Laboratório de Virologia, Vinícius Barreto Silva, Dean Frank Vicente da Silva e Jean Carlos Ribeiro Silva, pela amizade e auxílio neste trabalho.

Aos colegas professores da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, em especial às professoras Clévia Ferreira Duarte e Eula Maria de Melo Costa, bem como à equipe técnico-administrativa pelo apoio, durante esta jornada.

Ao Dr. Paulo Sérgio Sucasas da Costa pelo suporte clínico, apoio e envio de artigos de literatura.

Ao corpo técnico-administrativo do setor de Pediatria e Puericultura da Maternidade Nossa Senhora de Lurdes, de modo especial à Prof^a. Dr^a. Maria Ivone Vilela e às Auxiliares de Enfermagem Eleuza, Ivonete, Eri e Deuseli pela contribuição durante a coleta de amostras.

A todas as crianças que forneceram o espécime clínico para a realização deste trabalho, e aos seus responsáveis, que aceitaram participar desta pesquisa, o meu agradecimento.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE QUADROS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.2. PROPRIEDADES GERAIS DE <i>ROTAVIRUS A</i>	2
1.2.1. Estrutura Genômica, Morfológica e Protéica.....	2
1.2.2. Classificação dos <i>Rotavirus A</i>	9
1.2.3. Diagnóstico Laboratorial para <i>Rotavirus A</i>	11
1.2.3.1. Detecção Viral.....	11
1.2.3.2. Caracterização Viral.....	12
1.2.4. Patogenia.....	14
1.2.5. Epidemiologia.....	17
1.2.6. Estudos de Seguimento.....	19
1.2.7. Vacinas para <i>Rotavirus A</i>	20
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. OBJETIVO GERAL.....	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. TIPO DE ESTUDO.....	24

4.2. MATERIAL DE ESTUDO.....	24
4.3. METODOLOGIA.....	25
4.3.1. Detecção Viral.....	25
4.3.1.1. EGPA.....	25
4.3.1.2. EI ERA.....	26
4.3.2. Genotipagem G e P de <i>Rotavirus A</i>	26
4.3.2.1. Extração do <i>dsRNA</i> Viral.....	26
4.3.2.2. Primeira Reação de Amplificação (<i>RT-PCR</i>).....	27
4.3.2.3. Segunda Reação de Amplificação (<i>Nested-PCR</i>).....	31
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5. RESULTADOS.....	35
5.1. CARACTERÍSTICAS DAS CRIANÇAS ESTUDADAS.....	35
5.2. POSITIVIDADE PARA <i>ROTAVIRUS A</i>	40
5.3. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>ROTAVIRUS A</i>	43
6. DISCUSSÃO.....	44
7. CONCLUSÕES.....	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
9. ANEXOS.....	71
9.1. ANEXO 1.....	71
9.2. ANEXO 2.....	72
9.3. ANEXO 3.....	73
10. APÊNDICE.....	74
10.1. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	74

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Adenina
<i>bp</i>	Pares de bases
C	Citosina
Ca ²⁺	Íon cálcio
<i>cDNA</i>	<i>complement DNA</i> (DNA complementar)
Da	Dalton
dATP	Desoxiadenina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
dGTP	Desoxiguanina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
dTTP	Desoxitimina trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
<i>g</i>	Unidade média de força relativa
g	Gramma
G	Guanina
GE	Gastroenterite
GuSCN	Isotiocianato de guanidina
HCl	Ácido clorídrico
IME	Imunomicroscopia eletrônica
IgG	Imunoglobulina G
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
KCl	Cloreto de Potássio
kDa	Kilodalton

KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
M	Molar
mA	Miliampére
Mg^{2+}	Íon magnésio
MgCl_2	Cloreto de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
<i>mRNA</i>	<i>messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
μg	Micrograma
μM	Micromolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Na_2PO_4	Fosfato de sódio
nm	Nanômetro
NSP	<i>Non-Structural Protein</i> (Proteína não-estrutural)
NTP	Nucleotídeo trifosfato
pb	Pares de bases
PBS	Salina fosfatada tamponada
pH	Potencial hidrogeniônico
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucléico
<i>RRT-TV</i>	<i>Tetravalent Rhesus-Human Reassortant Rotavirus Vaccine</i> (Vacina tetravalente de origem símio-humana)
RV	Rotavírus

RVA	Rotavírus espécie (grupo) A
RVG	Rotavírus espécie (grupo) G
T	Timina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade de atividade enzimática
UFG	Universidade Federal de Goiás
UK	<i>United Kingdom</i>
VP	<i>Viral Protein</i> (Proteína viral)
°C	Graus Centrígrados
%	Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	DESIGNAÇÃO	PÁG.
Figura 1	Estrutura tridimensional da partícula de <i>Rotavirus A</i> .	4

LISTA DE QUADROS

QUADROS	DESIGNAÇÃO	PÁG.
Quadro 1	Número de amostras fecais coletadas em relação às crianças estudadas.	25
Quadro 2	Número de amostras fecais coletadas no estudo de seguimento em relação ao número de crianças estudadas.	25
Quadro 3	Número de crianças estudadas em estudo de seguimento em relação ao período de coleta.	26
Quadro 4	Seqüência de iniciadores utilizados para a transcrição reversa do <i>dsRNA</i> viral - reação em cadeia pela polimerase (<i>RT-PCR</i>) para caracterização de genótipos G e P das amostras de <i>Rotavirus A</i> isoladas.	30
Quadro 5	Protocolo utilizado na reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (<i>RT-PCR</i>) para genotipagem G de <i>Rotavirus A</i> - Primeira amplificação.	31
Quadro 6	Protocolo utilizado na reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (<i>RT-PCR</i>) para genotipagem P de <i>Rotavirus A</i> - Primeira amplificação.	32
Quadro 7	Protocolo utilizado na reação de <i>Nested-PCR</i> para genotipagem G de <i>Rotavirus A</i> - Segunda amplificação.	33
Quadro 8	Protocolo utilizado na reação de <i>Nested-PCR</i> para genotipagem P de <i>Rotavirus A</i> - Segunda amplificação.	34

Quadro 9	Número de crianças com quadro clínico em relação à faixa etária considerando as 119 crianças estudadas.	37
Quadro 10	Número de crianças do estudo de seguimento em relação ao quadro clínico por faixa etária. Características das crianças positivas para <i>Rotavirus A</i> em	38
Quadro 11	relação à faixa etária da criança quando da infecção, quadro clínico e número da amostra fecal positiva.	42

TABELAS	DESIGNAÇÃO	PÁG.
Tabela 1	Características das crianças estudadas em relação ao gênero. Positividade para <i>Rotavirus A</i> em crianças de 0 a 12 meses	36
Tabela 2	de idade em Goiânia-GO em relação ao gênero. Positividade para <i>Rotavirus A</i> em estudo de seguimento de	39
Tabela 3	crianças em Goiânia-GO em relação ao gênero. Positividade para <i>Rotavirus A</i> em relação ao mês de coleta	39
Tabela 4	- Janeiro de 2004 a Setembro de 2005. Positividade para <i>Rotavirus A</i> em relação ao número de	40
Tabela 5	meses de aleitamento materno, considerando as crianças em estudo de seguimento.	41

RESUMO

Rotavirus A é o principal agente da gastroenterite viral em todo o mundo com importante papel na mortalidade de crianças de até 5 anos de idade em países em

desenvolvimento. Este estudo objetivou a detecção do agente dentro de um segmento de crianças desde o nascimento até um ano de idade. Objetivou ainda a correlação da positividade à faixa etária da infecção primária, à sazonalidade e a caracterização das amostras detectadas através do padrão eletroferotípico e genotipagem G e P. Foram envolvidas inicialmente no estudo 119 crianças, sendo que 34 delas participaram do estudo de seguimento. A detecção de *Rotavirus A* foi feita pelo EI ERA e por EGPA e a genotipagem G e P foi feita por *RT-nested-PCR*. Foi observado que quatro crianças (0,6%) foram positivas para o *Rotavirus A* sendo três delas do estudo de seguimento, com a infecção se dando aos 5 e 6 meses de idade. A outra criança sofreu a infecção aos três meses de idade e não continuou no estudo. Das 119 crianças, 15 apresentaram gastroenterite durante o estudo e destas 12 pertenceram ao estudo de seguimento. Ademais, duas das crianças apresentaram mais de um episódio diarréico durante o estudo incluindo o da amostra positiva para o vírus. Uma criança não apresentou gastroenterite quando de sua amostra positiva. As quatro amostras positivas foram detectadas pelo EI ERA e duas delas também pelo EGPA e esta metodologia caracterizou as amostras como sendo idênticas e padrão longo (bbea). Nenhuma das quatro amostras *Rotavirus A* pode ser genotipada para G ou P. As quatro amostras positivas foram detectadas em diferentes meses do ano (janeiro, março, agosto e setembro) não podendo assim caracterizar uma sazonalidade. O conhecimento obtido deste estudo soma-se a outros já existentes e devem servir de subsídios para a estratégia de prevenção do vírus em andamento em todo o mundo.

ABSTRACT

Rotavirus A is the main agent of viral gastroenteritis worldwide and has an important role in morbidity and mortality from children up to five years old, in developing countries. This study aimed to detect the agent in children from the birth to one year old. It also aimed to analyze the positivity correlation about the primary infection age group, seasonality, and characterization of the positive samples through of electropherotyping profile and G and P genotyping. The study analyses samples from 119 children, but only 34 of them were enrolled in the prospective study. The *Rotavirus A* detection was performed by EI ERA and PAGE that allowed the definition of the viral electropherotypes. The genotyping G and P was performed by RT-nested-PCR. It was observed that four children were positive to *Rotavirus A*, and three of them were from the prospective study. The infection occurred when they were five and six months old. Another child was infected when it was three months old, but it did not continue in the research. Fifteen of the 119 children had gastroenteritis and 12 were part of the prospective study. Two children had more than one diarrheic episode during the study, including one of the children who was rotavirus positive. One child did not present gastroenteritis even though the sample was positive. The four positive samples were detected by EI ERA and two of them were also detected by PAGE. This methodology also characterized these samples as identical with long pattern (bbea). None of the four *Rotavirus A* positive samples could be genotyped for G or P. The four positive samples were detected in different months of the year (January, March, August and September), therefore, it couldn't be characterized as seasonal. The knowledge acquired throughout this study added to the ones that already exist shall help the undergoing virus prevention strategies worldwide.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A gastroenterite é causa importante de morbidade e mortalidade infantil, especialmente em países em desenvolvimento (Bern et al. 1992, Parashar et al. 2003). Em todo o mundo estima-se a ocorrência de 1,5 bilhões de casos de diarreia aguda por ano em crianças menores de cinco anos de idade, com cerca de três milhões de óbitos (Bern et al. 1992, Murray & Lopez 1997, Kapikian et al. 2001).

Muito embora os vírus tenham sido considerados como possíveis agentes etiológicos de gastroenterite desde a década de 1940 (Parashar et al. 1998), apenas em 1972 essa associação foi confirmada, a partir da visualização por imunomicroscopia eletrônica (IME) do vírus Norwalk, hoje classificado na família *Caliciviridae*, em amostras fecais de jovens e adultos com diarreia aguda (Kapikian et al. 1972, ICTV 2006).

Desde então, outros achados confirmaram o papel dos vírus na síndrome. Assim, Bishop et al. (1973) observaram por microscopia eletrônica (ME) a presença de partículas, hoje denominadas *Rotavirus A*, em cortes histológicos da mucosa duodenal de crianças com gastroenterite. Após, em 1975, os astrovírus (Madeley & Cosgrove 1975) e os adenovírus entéricos, foram identificados em fezes de crianças com quadro de diarreia aguda (Flewett et al. 1975).

Atualmente, mais de 20 vírus têm sido reconhecidos como agente causal de gastroenterite e, destes, são reconhecidas como clinicamente importantes vírus pertencentes a quatro famílias/gêneros: *Reoviridae/Rotavirus*, *Caliciviridae/Norovirus e Sapovirus*, *Adenoviridae/Mastadenovirus e Astroviridae/Mamastrovirus* (Wilhelmi et al. 2003).

Rotavirus A é o agente etiológico mais importante da gastroenterite viral aguda em crianças (Kapikian 1997). Considera-se que estes vírus sejam responsabilizados, anualmente, por aproximadamente 111 milhões de episódios de gastroenterite, 2 milhões de hospitalizações e 440 mil óbitos em crianças com menos de cinco anos de idade (Parashar et al. 2003).

A prevenção da gastroenterite por *Rotavirus A* bem como a diminuição da gravidade da doença tem sido admitida através da vacinação genotipos específica considerando ainda que essa deva ser aplicada nas crianças com menos de seis meses de idade. Essa assertiva é concordante à condição de que o controle e a erradicação desses agentes são hoje metas para a saúde pública em plano mundial.

1.2. PROPRIEDADES GERAIS DE *ROTAVIRUS A*

1.2.1. Estrutura genômica, morfológica e protéica

O genoma viral possui 11 segmentos de RNA fita dupla (*dsRNA*). Estes segmentos genômicos variam de 667 (segmento 11) a 3.302 pares de bases (segmento 1), com o genoma total contendo aproximadamente 18.522 pares de bases e massa molecular variando de 2×10^5 a $2,2 \times 10^6$ Da (Rixon et al. 1984, van Regenmortel et al. 2000).

Todos os segmentos de RNA têm início com guanidina-5', seguido por um conjunto de seqüências conservadas, parte da seqüência não codificadora da extremidade 5', e por um quadro aberto de leitura (*ORF - open reading frame*), o qual codifica no mínimo uma proteína. Finalizando o segmento, segue-se um conjunto de seqüências não codificadoras, que contêm um subconjunto de seqüências conservadas terminais 3' finalizado com uma citidina-3' seguida do códon de parada (Estes & Cohen 1989, Estes 2001) (Figura 1).

Os *Rotavirus A* são vírus desnudos, com simetria icosaédrica e, aproximadamente, 100 nm de diâmetro. Apresentam três camadas concêntricas de proteínas (capsídeo) que circundam o genoma viral. A camada mais interna ou *core* (Figura 1C), que envolve o genoma é formada por 60 dímeros de proteína VP2, que interage com VP1 e VP3 organizados na forma de 12 complexos enzimáticos aderidos à superfície interna de VP2, sendo que as proteínas VP1 e VP3 ligam-se diretamente ao RNA. A camada intermediária é formada por 260 trímeros de VP6 formando partículas virais de dupla camada (*DLPs*). A camada externa é composta de duas proteínas, VP4 e VP7 (Figura 1B). A superfície externa plana do vírus é formada de 780 cópias da proteína VP7, organizadas como trímeros, enquanto 120 cópias de VP4 estão dispostas como espículas, organizadas como dímeros, projetando-se aproximadamente em 12 nm da superfície externa (Estes & Cohen 1989, Estes 2001, Pesavento et al. 2003).

As partículas maduras de *Rotavirus A* possuem seis proteínas estruturais (Figura 1B e 1C), designadas pela sigla VP seguida de um número arábico (VP1, 2, 3, 4, 6, 7). Adicionalmente, durante o ciclo de infecção viral, a proteína VP4 é clivada gerando duas proteínas as quais são designadas pela adição de “asterisco” após o número, VP5* e VP8* (Estes & Cohen 1989).

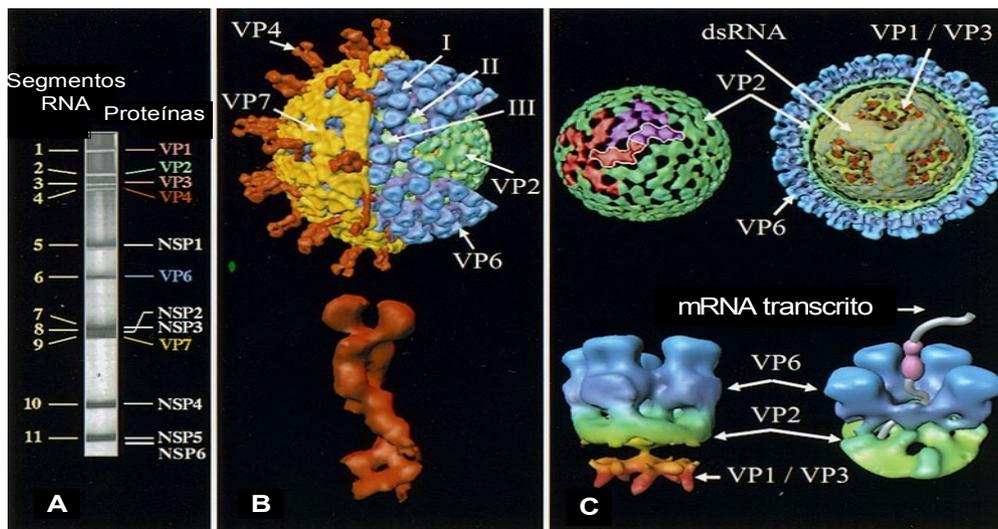


Figura 1. Estrutura tridimensional da partícula de *Rotavirus A*. **A** – Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando os 11 segmentos do *dsRNA* formando o genoma viral (neste exemplo SA-11) e as proteínas codificadas por cada um desses segmentos. **B** – Estrutura tridimensional da partícula completa dos rotavírus determinada por eletrocriomicroscopia associada ao processamento da imagem por computador. **C** – Estrutura tridimensional da camada intermediária e interna da partícula viral determinada também por eletrocriomicroscopia associada ao processamento da imagem por computador (modificado de Estes 2001).

VP1 - A proteína VP1 é codificada pelo segmento 1 de RNA. Possui massa molecular de aproximadamente 125 kDa, sendo constituída por 1088 aminoácidos (aa). Além de formar o *core* viral pela associação com VP2 e VP3 (Cohen et al. 1989, Estes & Cohen 1989), admite-se que esta seja a RNA polimerase do vírus, com atividades de transcriptase e replicase (Cohen et al. 1989, Patton et al. 1993, Mattion et al. 1994, Zeng et al. 1996) muito embora o pressuposto de que a atividade de replicase requiera a presença de VP2 (Patton et al. 1993).

VP2 – VP2 é codificada pelo segmento 2. Possui aproximadamente 102 kDa, sendo constituída por 880 aa (Liu et al. 1988). É a proteína estrutural mais abundante do *core* viral, é imunogênica e admite-se que os anticorpos para esta proteína sejam indicadores de infecção primária (Bican et al. 1982, Svensson et al. 1987, Conner et al. 1988, Liu et al. 1988). A proteína possui afinidade não específica tanto para RNA fita

simples (*ssRNA*) quanto para *dsRNA*, com maior afinidade para *ssRNA* (Boyle & Holmes 1986). A afinidade de VP2 por *ssRNA* parece estar associada com o empacotamento do *mRNA* viral dentro do *core* durante o processo de replicação (Kapahnke et al. 1986).

VP3 – A VP3 é codificada pelo segmento 3. Possui 98 kDa, sendo constituída por 835 aa (Liu et al. 1988). Tem sido mostrado que VP3 pode ligar-se a região N-terminal de VP2, região na qual VP1 também se liga, sendo esta região requerida para a replicação (Labbe et al. 1994, Zeng et al. 1998). VP3 liga-se covalentemente a guanosina trifosfato (GTP), o que sugere ser esta uma guanililtransferase (Pizarro et al. 1991, Liu et al. 1992). Essa proteína também é considerada como uma metiltransferase, por possuir atividade de acoplar resíduos *cap* aos *mRNAs* transcritos (Chen et al. 1999, Patton & Chen 1999).

VP4 – A proteína VP4 constitui, juntamente com VP7, a camada externa do vírus. É codificada pelo segmento 4, possui aproximadamente 88 kDa, sendo constituída por 776 aa (Liu et al. 1988, Estes & Cohen 1989, Shaw et al. 1993). Várias funções têm sido atribuídas à essa proteína: adsorção e penetração viral, atividade de hemaglutinação e associação à restrição do crescimento viral em cultura celular (Greenberg et al. 1983b). VP4 induz a formação de anticorpos neutralizantes (Hoshino et al. 1985, Offit & Blavat 1986), tanto *in vitro* (Greenberg et al. 1983a, Coulson et al. 1985, Hoshino et al. 1985, Taniguchi et al. 1985, Burns et al. 1988), quanto *in vivo*, observada a partir de imunização passiva de camudongos (Offit et al. 1986) sendo responsável pela determinação dos denominados sorotipos/genotipos P. É susceptível a proteólise, processo que facilita a entrada do vírus na célula (Kaljot et al. 1988) onde são gerados duas proteínas, VP8* (28 kDa, 247 aa) e VP5* (60 kDa, 529 aa),

necessárias para completude da adsorção e penetração do vírus na célula (Coulson et al. 1997, Guerrero et al. 2000, Zarate et al. 2000).

VP6 – É a proteína que forma a camada intermediária do vírus. Possui 41 kDa, sendo constituída por 397 aa, é codificada pelo segmento 6 do genoma viral e constitui cerca de 50-60% da massa viral (Estes & Cohen 1989, Prasad & Chiu 1994). A VP6 tem papel essencial na estrutura do vírus uma vez que faz interações, tanto com ambas as proteínas da camada externa (VP4 e VP7), quanto com a proteína do *core* (VP2). Apresenta-se na forma trímeros, é extremamente estável, hidrofóbica e altamente imunogênica (Gorziglia et al. 1985, Estes et al. 1987, Sabara et al. 1987, Burns et al. 1996). A VP6 apresenta epítomos antigênicos comuns que caracterizam os antígenos de grupo (espécie- RVA-RVG)). Ademais, nessa proteína, a presença ou a ausência de outros determinantes antigênicos determina também a especificidade para subgrupos (I, II, I e II, NI NII) (Kalica et al. 1981, Greenberg et al. 1983c).

VP7 – A proteína possui 326 aa e 37 kDa, podendo ser codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9 do genoma, dependendo da amostra viral (Estes & Cohen 1989, Prasad et al. 1990). É uma glicoproteína e forma a camada externa do vírus. É considerada como antígeno maior de neutralização sendo responsável pela determinação dos sorotipos G (Kalica et al. 1981, Greenberg et al. 1983b, Hoshino & Kapikian 1996). Experimentos em culturas celulares indicam que essa proteína desempenha papel na adsorção viral conferindo estabilidade às espículas de VP4 e facilitando a apresentação dos epítomos funcionais dessa proteína (Prasad & Estes 1997). Sua interação com VP4 parece também exercer influência na especificidade de ligação de VP4 ao receptor celular da célula alvo (Sabara et al. 1985, Ludert et al. 1996).

Além das seis proteínas estruturais, o genoma dos *Rotavirus A* codifica outras seis proteínas não estruturais, designadas pela sigla NSP, seguida de um número arábico de 1 a 6, que varia de acordo com a sua ordem de migração em gel de poliacrilamida (Prasad & Estes 1997). Destas, cinco estão envolvidas na replicação viral (NSP1, NSP2, NSP3, NSP5 e NSP6) e uma (NSP4) na morfogênese e virulência viral. Todas as proteínas não estruturais, exceto NSP4, interagem com o ácido nucléico viral (Estes 2001).

NSP1 - É uma proteína com 58 kDa, formada por 495 aa e codificada pelo segmento 5 do genoma viral. É expressa em baixos níveis na célula infectada. Estudos indicam que NSP1 apresenta-se de forma pontuada no citoplasma e que possivelmente faça associação com o citoesqueleto (Hua & Patton 1994).

NSP2 - A proteína é codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9, dependendo da amostra viral. Possui 35 kDa e 317 aa e tem habilidade de ligar-se não especificamente ao *ssRNA*, o que permite a formação de complexos de ribonucleoproteína (Kattoura et al. 1992, Taraporewala et al. 1999). É expressa em altos níveis nas células infectadas, sendo acumulada no viroplasma (Petrie et al. 1984). Estudos indicam que NSP2 é essencial para a formação do viroplasma e para a replicação genômica (Ramig & Petrie 1984, Gombold et al. 1985). Possui atividade de nucleotídeo trifosfatase (NTPase) que, na presença de Mg^{2+} , catalisa a hidrólise de todos os quatros NTPs para nucleotídeos difosfato (NDPs). Sugere-se que a atividade NTPase de NSP2 forneça à proteína a energia necessária para funcionar como um motor molecular dirigindo o empacotamento do *mRNA* viral (Taraporewala et al. 1999, Taraporewala & Patton 2001).

NSP3 - É codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9 do genoma viral. Possui 63 kDa e 315 aa, é uma proteína ácida e pouco abundante na célula infectada (Estes 2001). Na

célula hospedeira, a mensagem de capeamento é reconhecida pelo fator de iniciação eucariótica (eIF4E) e a mensagem de poliadenilação por uma poli (A) ligante de proteína (PABP), os quais vão interagir com o fator eIF4G, uma proteína adaptadora que é responsável pela entrega da mensagem *cap* e poliadenilação para o ribossomo. Embora os *Rotavirus A* não possuem cauda poli (A), estes possuem uma seqüência consenso na sua extremidade terminal 3' que se liga ao domínio N-terminal NSP3 e, no processo, metade do domínio C-terminal da proteína também interage com eIF4G e com uma afinidade maior que com PABP, possibilitando uma tradução viral seletiva durante a infecção. Desta forma, NSP3 é uma proteína codificada pelo vírus para subverter a maquinaria de tradução da célula hospedeira e seletivamente aumentar a tradução do *mRNA* viral (Poncet et al. 1993, Piron et al. 1998, Vende et al. 2000, Deo et al. 2002, Groft & Burley 2002, Jayaram et al. 2004).

NSP4 – É codificada pelo segmento genômico 10, é proteína glicosilada e ligada ao retículo endoplasmático. Possui 28 kDa e 175 aa (Mattion et al. 1994, Tian et al. 1996). É uma proteína que não se liga ao RNA mas possui papel na morfogênese viral e também na virulência por funcionar como uma enterotoxina. Na morfogênese viral ela funciona como um receptor intracelular por mediar a conversão de partículas de dupla camada no citoplasma para partículas de tripla camada no RE (Bern & Glass 1994, Ball et al. 1996). Quando inoculada em camundongos lactentes produziu diarreia tendo o resíduo de tirosina 131 da proteína sido considerado como o aminoácido associado com sua atividade toxigênica (Ball et al. 1996, Dong et al. 1997, Morris et al. 1999).

NSP5 – É uma das duas proteínas codificadas pelo segmento 11. Possui 198 aa, sendo acumulada no viroplasma. É uma proteína ácida, rica em serina e resíduos de treonina, que formam dímeros (Poncet et al. 1997). A co-expressão desta proteína em células tem mostrado que ela é hiperfosforilada por NSP2 (Afrikanova et al. 1998),

muito embora este mecanismo ainda seja pouco conhecido (Welch et al. 1989, Poncet et al. 1997, Afrikanova et al. 1998, Gonzáles et al. 1998). Ao contrário de NSP2, NSP5 liga-se eficientemente tanto ao *ssRNA* quanto ao *dsRNA* (Vende et al. 2002).

NSP6 – É a menor proteína dos rotavírus (11kDa) sendo codificada pelo *ORF* alternativo do segmento 11. Possui 92 aa, fica acumulada no viroplasma, e é conhecida por interagir com NSP5 (Mattion et al. 1991, Torres-Vega et al. 2000). O baixo nível de expressão de NSP6 nas células infectadas por rotavírus sugere uma função reguladora da proteína. Algumas amostras de *Rotavirus A*, como Mc323 e Alabama, bem como os *Rotavirus C* não codificam NSP6 (Torres-Vega et al. 2000). Isto sugere que NSP6 pode não ser necessária para a replicação viral, ou mesmo que nenhuma proteína viral ou celular substitua funcionalmente, nessas amostras, a NSP6 (Taraporewala & Patton 2004).

1.2.2. Classificação dos *Rotavirus A*

Os rotavírus infectam somente vertebrados (mamíferos e aves), incluindo humanos. Constituem um gênero da família *Reoviridae*, que possui atualmente doze gêneros (*Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Coltivirus*, *Aquareovirus*, *Cypovirus*, *Fijivirus*, *Phytoreovirus*, *Oryzavirus*, *Seadornavirus*, *Idnoreovirus*, *Mycoreovirus* e *Rotavirus*). (ICTV 2005).

O gênero *Rotavirus* compreende sete espécies (grupos) designadas de RVA a RVG, sendo esta especificidade determinada pela proteína VP6 (Hoshino & Kapikian 2000, Mertens et al. 2000, van Regenmortel et al. 2000). As espécies A, B e C são encontradas em animais e humanos e as demais somente em animais (Estes 2001). Adicionalmente, os *Rotavirus A* são sorologicamente classificados em subgrupos

também em função da variabilidade da proteína VP6, os quais são denominados I, II, I e II, não I não II (Greenberg et al. 1983a, van Regenmortel et al. 2000).

Estes vírus são ainda classificados em sorotipos/genotipos considerando as duas proteínas do capsídeo externo (VP7 e VP4) em função da variabilidade dos genes que as codificam. A classificação em sorotipos é definida por ensaios sorológicos, como neutralização por redução de placa em cultura celular e neutralização por redução foco-fluorescente usando anticorpos monoclonais (MAbs) purificados provenientes de animais hiperimunizados. Esses ensaios baseiam-se na reatividade de anticorpos com as duas proteínas, as quais induzem anticorpos com atividade neutralizante (Kalica et al. 1983, Hoshino et al. 1985, Offit & Blavat 1986, Hoshino et al. 1988). Os genotipos são determinados por métodos moleculares, como seqüenciamento genômico, hibridização de ácido nucléico ou ainda pela reação em cadeia pela polimerase (*PCR*) utilizando iniciadores específicos para os genes das proteínas VP4 e VP7 (Flores et al. 1989, Gouvea et al. 1990, Estes 2001).

A proteína VP7 define, como referido, os chamados genotipos/sorotipos G em função de ser esta uma glicoproteína, e a VP4 os genotipos/sorotipos P por ser esta sensível a proteases. Todos os genotipos G correspondem aos sorotipos G, não ocorrendo o mesmo com os genotipos P (Desselberger 2000). Em assim sendo têm sido definidos 15 sorotipos/genotipos G e 25 genotipos P e, devido à insuficiência de anticorpos monoclonais específicos para a diversidade dos sorotipos P, somente 14 sorotipos P, com três subtipos (Rao et al. 2000, Estes 2001, Hoshino et al. 2002, Liprandi et al. 2003, Martella et al. 2003, McNeal et al. 2005, Rahman et al. 2005). Os sorotipos/genotipos G são sempre designados pela letra G seguida de algarismo arábico, o mesmo ocorrendo para sorotipo P, enquanto que para genotipo P a denominação é

feita pela letra P seguida do algarismo arábico colocado entre colchetes (Hoshino & Kapikian 1996).

Dos 15 genótipos G, dez (G1-G6, G8-G10 e G12) e dos 25 genótipos P, onze (P[1], P[3]-P[6], P[8]-P[11], P[14] e P[19]) infectam humanos (Nakagomi et al. 1994, Hoshino & Kapikian 2000, Jagannath et al. 2000, Okada et al. 2000). Ainda, em humanos, tem sido observada ocorrência maior de cinco genótipos G (G1-G4 e G9) e de três genótipos P (P[4], P[6] e P[8]) sendo que as combinações G e P mais comumente observadas são P[8],G1; P[4],G2; P[8],G3; P[8],G4; P[6],G9 e P[8],G9 (Gentsch et al. 1996, Leite et al. 1996, Ramachandran et al. 1996, Santos & Hoshino 2005).

A classificação antigênica dos *Rotavirus A* também se dá em função do gene 10 que apresenta extensiva variabilidade, o que leva o seu produto, a proteína NSP4, ser classificado em cinco genótipos: A (KUN), B (Wa), C (AU-1), D (EW) e E (*avian-like*) (Ciarlet et al. 2000, Ito et al. 2001, Mori et al. 2002).

1.2.3. Diagnóstico laboratorial para *Rotavirus A*

A sintomatologia ocasionada por *Rotavirus A* é insuficiente para definir o agente como causador da infecção sendo necessário o exame laboratorial virológico (Estes 2001). Em assim sendo diferentes procedimentos têm sido desenvolvidos visando não somente a detecção viral como também à caracterização da amostra viral infectante (Fischer & Gentsch 2004).

1.2.3.1. Detecção Viral

As fezes são o espécime clínico universalmente utilizado para detecção viral bem como para a caracterização de amostras. Estas devem ser colhidas preferencialmente até quatro dias após o início da doença, muito embora a excreção

viral possa se estender por mais de três semanas pós-infecção (Riepenhoff -Talty et al. 1981, Yolken & Wilde 1994).

A detecção pode ser feita pela visualização da partícula viral através da ME ou IME, ou pela detecção de antígeno viral utilizando uma variedade de metodologias, dentre estas, o ensaio imunoenzimático (EIE), o teste de aglutinação passiva (HAP) e imunofluorescência (IF) (Birch et al. 1979, Sanekata et al. 1981). Adicionalmente a presença viral, pode ser observada pela detecção do ácido nucléico, seja utilizando metodologia de amplificação genômica, reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (*RT-PCR*) (Gouvea et al. 1991, Gentsch et al. 1992), ou sem amplificação, o que pode ser feito por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) (Pereira et al. 1983) ou ainda por hibridização molecular (Flores et al. 1989, Fernandez et al. 1992).

O isolamento viral também pode ser realizado, muito embora exista a dificuldade de se propagar vírus selvagem. Dentre as linhagens celulares utilizadas para a propagação, estão a MA-104 (células de rim de macaco *Rhesus*) e a CaCo-2 (células de carcinoma de cólon humano) (Hasegawa et al. 1982, Svensson et al. 1991, Ciarlet & Estes 2001).

1.2.3.2. Caracterização Viral

A determinação dos sorotipos/genotipos G e P de *Rotavirus A* constitui a meta primária quando se objetiva principalmente a vigilância laboratorial das amostras circulantes incluindo o fato do reflexo no processo vacinal. O sorotipo viral pode ser determinado por ensaio de neutralização em cultura celular ou por EIE bem como por IME de fase-sólida utilizando anticorpos monoclonais sorotipo-específicos (MAbs) de VP7 e de VP4 (Greenberg et al. 1983c, Yolken & Wilde 1994, Coulson 1996, Hoshino

& Kapikian 1996). A sorotipagem G através de EIE utilizando MAbs específicos produzidos para os diferentes sorotipos de VP7 é método comum de caracterização (Greenberg et al. 1983c, Coulson 1996). A sorotipagem P, por outro lado, é pouco realizada, em função da pequena disponibilidade de MAbs específicos para VP4, atribuído ao possível fato de esta proteína poder ser degradada durante o manuseio ou a estocagem do vírus (Estes & Cohen 1989, Coulson 1996, Hoshino & Kapikian 1996).

Métodos moleculares foram desenvolvidos a partir da década de 1990, visando determinar os genótipos de VP7 e VP4. Dentre estes, o método *multiplex-nested-RT-PCR* apresenta boa correlação de tipos para VP7 identificados por procedimento sorológico utilizando MAbs. Neste ensaio, são comumente usados para a genotipagem G, dois conjuntos de iniciadores consensuais: Beg9/End9, combinado com iniciadores específicos (G1-G4, G8 e G9) (Gouvea et al. 1990) ou 9Con1/9Con2 combinado com iniciadores específicos (G1-G4 e G9) (Das et al. 1994). Procedimento modificado também tem sido utilizado onde se usa os iniciadores consensuais Beg9/End9 para *RT-PCR* e 9Con1 (Das et al. 1994), com a inclusão dos iniciadores específicos G1-G9, na reação de *multiplex-nested-RT-PCR* (Fischer et al. 2003).

A genotipagem P é bastante realizada e esta tem sido feita como para a genotipagem G, através de *multiplex-nested-RT-PCR* (Gentsch et al. 1992, Gunasena et al. 1993), ou através de *PCR* com sondas obtidas a partir de sorotipos de VP4 determinados por neutralização (Larralde & Flores 1990). Para determinação dos genótipos P, têm sido usados dois conjuntos de iniciadores consensuais: Con3/Con2 e HumCom5/HumCom3 combinados com iniciadores específicos para os genótipos P[8], P[4], P[9], P[10] e P[6] (Gentsch et al. 1992, Gunasena et al. 1993).

Para a confirmação dos genótipos determinados por *RT-PCR*, ou mesmo para a definição daqueles que não puderam ser tipados por outras metodologias, tem sido

utilizado o seqüenciamento genômico, o qual pode ser feito diretamente utilizando o produto da *RT-PCR* (seqüenciamento direto) ou após a clonagem desse produto. O seqüenciamento permite também discriminar a origem da amostra, se humana ou animal (Gouvea et al. 1993), além de permitir a identificação de novos genótipos (Leite et al. 1996, Ramachandran et al. 1996).

Outras metodologias também têm sido utilizadas para a determinação de genótipos, ou para confirmação dos resultados da genotipagem, dentre elas a hibridização molecular utilizando sondas específicas de genótipos G e P marcados com digoxigenina (Leite et al. 1996, Ramachandran et al. 1996). Adicionalmente, estas necessidades têm sido atendidas através da técnica de análise do polimorfismo de fragmentos de DNA a partir da clivagem com enzimas de restrição (*RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism*) pós-*RT-PCR* (Iizuka et al. 1993), além da hibridização em *microarray*, que permite tanto a detecção quanto a genotipagem de rotavírus. Esse método combina a grande sensibilidade da *PCR* com a seletividade da hibridização DNA-DNA (Chizhikov et al. 2002).

1.2.4. Patogenia

A via de infecção para *Rotavirus A* é a fecal-oral, apesar da descrição de contaminação por via respiratória (Dennehy 2000). A excreção viral ocorre em concentrações de até um trilhão de partículas/mL de fezes, sendo que a carga infectante é de apenas dez partículas viáveis, denotando a elevada infectividade destes vírus (Versikari et al. 1981, Ward et al. 1986).

Os *Rotavirus A* possuem tropismo natural por enterócitos maduros das vilosidades do intestino delgado, particularmente da mucosa do jejuno (Bass et al. 1990). Conforme referido, a adsorção destes vírus à célula hospedeira é feita através da

proteína VP4, após clivagem pela tripsina pancreática em VP5* e VP8* (Ludert et al. 1996, Crawford et al. 2001) sendo a penetração na célula mediada por VP4 e auxiliada pela VP7 (Hewish et al. 2000, Ciarlet et al. 2002).

A penetração do vírus na célula pode ocorrer diretamente através da membrana celular ou ainda por endocitose. Este passo é antecedido pela adsorção à membrana celular, processo que envolve inicialmente receptores contendo ácido siálico e integrinas tais como $\alpha v \beta 3$, $\alpha 4 \beta 1$, $\alpha 2 \beta 1$, durante os passos subsequentes (Coulson et al. 1997, Guerrero et al. 2000, Zarate et al. 2000). Admite-se que o domínio VP8* seja envolvido na interação com ácido siálico, enquanto VP5* com as integrinas. Não obstante, a utilização de ácido siálico não é feita por todas as amostras de rotavírus desde que grande número de amostras provenientes de animais, incluindo de humanos, não o utilizam como receptor inicial (Ciarlet et al. 2001). Nessas amostras, a maioria dos anticorpos monoclonais neutralizantes que reconhecem VP4 selecionam mutações em VP5*, sugerindo que a entrada na célula é mediada por VP5* (Kobayashi et al. 1990, Padilla-Noriega et al. 1995, Kirkwood et al. 1996).

A replicação viral ocorre em toda a sua extensão no citoplasma. Os *mRNAs* são sintetizados de forma ordenada, iniciando-se pelos segmentos menores e posteriormente pelos maiores (Patton & Gallegos 1990). As proteínas virais são sintetizadas em ribossomos livres, à exceção de VP7 e NSP4, que são sintetizadas em ribossomos ligados ao retículo endoplasmático rugoso (RER) (Estes 2001). A montagem das partículas de duplo capsídeo (*core* viral e VP6) parece ocorrer em estruturas eletrodensas perinucleares denominadas viroplasmas e a maturação final, no interior do RER, na dependência de íons Ca^{2+} , sendo transitoriamente envelopadas. Finalmente, as partículas recebem o capsídeo externo (VP4 e VP7) antes ou após o brotamento a partir

do retículo endoplasmático, sendo liberadas após a lise celular, infectando outros enterócitos (Estes 2001).

No processo, do ponto de vista celular, Tian et al. (1995) demonstraram que a NSP4 desencadeia a liberação de íons Ca^{2+} do RER para o citoplasma, acarretando a ativação de enzimas intracelulares e morte celular com liberação de vírus maduros. Admite-se ainda que a proteína interaja com um receptor celular do epitélio intestinal e estimule um sinal de tradução cálcio-dependente que aumenta a permeabilidade da membrana plasmática a íons cloro e potencializa a secreção clorídrica, o que culmina na indução de diarreia aquosa com possibilidade de perdas fluídicas e eletrólitos (Ball et al. 1996, Dong et al. 1997, Morris et al. 1999).

Do ponto de vista fisiopatológico, admitem-se mecanismos distintos para o processo diarreico. Segundo Blaclow & Greenberg (1991), o mecanismo osmótico ocorreria por destruição dos enterócitos maduros e baixa absorção intestinal de lactose, com conseqüente aumento do *gap* osmolar intestinal e de perdas líquidas. Ainda, Lundgren et al. (2000) postulam que estes vírus sejam capazes de induzir a secreção intestinal de líquidos e eletrólitos por ativação direta do sistema nervoso da parede intestinal, o sistema nervoso entérico.

O período de incubação para a infecção pelo *Rotavirus A* é estimado em dois a quatro dias (Bernstein & Ward 1998) o qual pode seguir-se ao quadro clínico abrupto e clássico da gastroenterite causada por estes vírus: 1 – vômitos – que se constituem habitualmente na manifestação clínica inicial, precedendo o quadro diarreico em 12 a 24 horas (Toporovski & Toporovski 1987), com incidência variável de 58 a 96% dos casos e com duração média de dois dias e meio (Rodriguez et al. 1977, Uhnoo et al. 1986, Toporovski & Toporovski 1987, Friedman et al. 1988); 2 – febre – é geralmente elevada, ocorrendo em cerca de 70 % das infecções, com duração média de 2,6 dias

(Rodriguez et al. 1977, Linhares et al. 1994); 3 – quadro diarréico – geralmente instala-se de forma abrupta, com fezes líquidas e explosivas, apresentando, via de regra, até dez episódios por dia (Bernstein & Ward 1998) sendo muita rara presença de sangue, macroscópico ou oculto, nas fezes (Clemens et al. 1983, Uhnnoo et al. 1986).

1.2.5. Epidemiologia

Admite-se que as crianças sejam infectadas por *Rotavirus A* em seus primeiros quatro anos de vida e que a doença causada por estes agentes ocorra mais freqüentemente dos seis aos 24 meses de idade, com pico maior de infecção dos seis aos nove meses em países em desenvolvimento e dos nove aos 15 meses em países industrializados (Breese et al. 1999, Costa et al. 2004).

Em geral, a incidência das infecções sintomáticas assume maior expressão na faixa etária de 6 a 24 meses e, em contrapartida, prevalecem as formas inaparentes entre recém nascidos e lactentes até os 3-4 meses, provavelmente como decorrência da proteção conferida pelos anticorpos de origem materna (Linhares et al. 1989, Bishop et al. 1996). Os levantamentos epidemiológicos da infecção por *Rotavirus A* apresentam variações significativas. Em escala mundial, De Zoysa & Feachem (1985), revisando estudos conduzidos em 37 países, observaram a incidência de 12 a 71% (média 34%) de identificação de *Rotavirus A* em crianças de até 36 meses de idade com diarreia aguda em atendimento ambulatorial ou hospitalar.

Em países em desenvolvimento, os *Rotavirus A* constituem-se numa das importantes causas de mortalidade em crianças (Offit 2002), com cerca de 500.000 a 600.000 óbitos anuais (Miller & McCann 2001). Por outro lado nos países desenvolvidos como os Estados Unidos a incidência é de cerca de 40 óbitos anuais em

indivíduos menores de cinco anos tendo como causa a infecção por estes agentes (Glass et al. 1996)

Dados epidemiológicos revisados no Brasil demonstram variações na incidência de gastroenterite associada à *Rotavirus A* em crianças atendidas em ambulatórios ou hospitais, da ordem de 12 a 42% (Pereira et al. 1993, Linhares 2000).

Em Goiânia, Goiás, dados relativos à infecção por estes vírus mostram incidência média de 31,2% quando em processo de gastroenterite e de 2,8% nos casos de não gastroenterite (Cardoso et al. 1992, 2003; Costa et al. 2004).

Adicionalmente, a infecção neonatal por *Rotavirus A* apresenta aspectos peculiares. Nesse sentido, observa-se alta prevalência (provável infecção nosocomial) em recém-nascidos internados, com identificação de rotavírus em cerca de 11 a 35% dos neonatos e elevado índice de assintomáticos, variando de 82,3 a 100% (Benatvala et al. 1978, Albert et al. 1987, Al-Frayh et al. 1987, Linhares et al. 2002).

Há uma tendência à sazonalidade na infecção por rotavírus, ocorrendo de forma predominante no inverno em regiões de clima temperado e se fazendo presente por todo o ano em áreas de clima tropical (Tiemessen et al. 1989, Breese et al. 1999, Inouye et al. 2000). No Brasil, as regiões Sudeste e Centro-Oeste apresentam pico predominante nos meses secos, de abril a agosto (Gomes et al. 1991, Cardoso et al. 1992, 2003; Stewien et al. 1993), ao contrário das regiões Nordeste e Norte, onde a sazonalidade não é tão marcante (Linhares et al. 1989, Stewien et al. 1991).

Gentsch et al. (1996) concluíram que, apesar da variação da prevalência dos diferentes sorotipos/genotipos ao longo do tempo, há um predomínio, em escala global, das amostras caracterizadas como G1P[8] o que também tem sido visto por outros pesquisadores (Iturriza-Gómarra et al. 2001).

Entretanto, Masendycz et al. (2001) em levantamento epidemiológico na Austrália de 1.108 amostras fecais de crianças com gastroenterite, evidenciaram o sorotipo G9 (18,1%) como o segundo mais prevalente após o G1 (49,5%), seguido dos sorotipos G2 (12,5 %) e G4 (9,7%). A ocorrência de G9 tem sido também relatada por outros autores (Souza et al. 2003, Costa et al. 2004).

Outros sorotipos de menor incidência, como o G5, já foram isolados em amostras fecais de crianças com diarreia aguda (Gouvea et al. 1994, Cardoso et al. 2000).

1.2.6. Estudos de Seguimento

O acompanhamento de determinadas crianças com o intuito de se avaliar prospectivamente a infecção por *Rotavirus A* foi alvo de vários estudos. Nesse sentido, foram estudados distintos grupos de pacientes: crianças desde o nascimento (infectadas ou não por rotavírus no período neonatal) até dois ou três anos de idade; amostras provenientes de crianças de creche; estudos de eficácia de candidatas à vacina e estudos de avaliação de imunidade (através da dosagem de anticorpos) em relação a infecções sucessivas por rotavírus. Adicionalmente, foram avaliados o grau de proteção, do ponto de vista clínico e/ou laboratorial, conferido pela infecção por estes vírus, objetivando o delineamento de estratégias vacinais seguras e efetivas (Wyatt et al. 1979, Gurwith et al. 1981, Bishop et al. 1983, Mata et al. 1983, Chiba et al. 1986, Flores et al. 1987, O’Ryan et al. 1990, Ruuska & Vesikari 1991, Moulton et al. 1998).

No Brasil poucos são os estudos de seguimento visando detecção de infecção primária e re-infecção por *Rotavirus A*. Nesse sentido, o estudo realizado em Belém-PA visava triagem vacinal onde foram monitoradas crianças desde o nascimento até os três anos de idade (Linhares et al. 1989).

Em Goiânia, Goiás, um único estudo de seguimento foi até o momento realizado (Costa 2003). Neste estudo procedeu-se ao seguimento de dois grupos de crianças de até cinco anos de idade, sendo um deles composto por crianças fora do período neonatal que, ao atendimento inicial, possuía o quadro de gastroenterite e o segundo que não possuía o quadro (grupo controle). O seguimento foi de um ano não tendo sido observado re-infecções por *Rotavirus A* nas crianças com gastroenterite e positivas à primeira amostragem. Por outro lado, foi observada infecção pelo vírus em duas crianças do grupo controle.

1.2.7. Vacinas para *Rotavirus A*

É consensual a observação de que para *Rotavirus A* os indicadores de morbidade são semelhantes, tanto em países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento (Breese et al. 1999) o que se traduz na eficácia limitada da adoção de medidas de saneamento básico e de melhores condições de higiene, bem como na necessidade do desenvolvimento e implementação de uma vacina segura e eficaz (Linhares & Breese 2000).

Desde as primeiras investigações com as vacinas *Jennerianas de Rotavirus A* atenuados de origem animal (*RIT 4237*, *WC3* e *MMU-18006*), desenvolvidas na década de 80 (Versikari et al. 1985, Flores et al. 1987), a primeira vacina de rotavírus licenciada para uso humano nos Estados Unidos (American Academy of Pediatrics 1998, Centers For Disease Control And Prevention 1999a) foi a vacina tetravalente rearranjada de origem símio e humana (*RotashieldTM*). Nessa vacina, a amostra MMU 18006 de origem símia atenuada com especificidade de VP7 para G3 foi associada a três outras amostras rearranjadas geneticamente com a VP7 de origem humana, com especificidade para G1, G2 e G4 respectivamente (Kapikian et al. 1996). Esta vacina foi

implantada em agosto de 1998. Entretanto, em setembro de 1999, após cerca de 1,5 milhão de doses aplicadas, seu uso foi interrompido, uma vez que 23 casos de intussuscepção alertavam para esse possível evento adverso (American Academy of Pediatrics 1998). Cerca de um mês após, dados mais expressivos revelaram 114 registros de invaginação intestinal associados à *RRT-TV* e determinaram a suspensão definitiva do uso da *Rotashield*TM no território americano (Centers For Disease Control And Prevention 1999b).

Hoje se dispõem no mercado da vacina rotavírus humano atenuada a 89-12 (*Rotarix*TM – Glaxo Smithkline and Avant Immunotherapeutics, Inc, Needham, MA, USA) com especificidade para G1P[8] e com proteção até 100% em relação a hospitalizações (Bernstein et al. 1999, 2002). No Brasil, esta foi introduzida no plano nacional de imunização desde março de 2006 (Informe Técnico Institucional 2006).

Outras vacinas encontram-se em fase de triagem como a RV3 (Barnes et al. 2002), de amostra de rotavírus neonatal atenuado com especificidade para G3P[6], a vacina multivalente bovino-humana *UK reassortant rotavirus vaccine* (Clements-Mann et al. 2001). Finalmente hoje conta-se também com a vacina pentavalente *Rotateq*TM (Clark et al. 1996), (Merck and Co, West Poin, PA) já licenciada nos Estados Unidos.

2. JUSTIFICATIVA

A infecção por *Rotavirus A* é causa importante de doença infantil em todo o mundo com risco maior de hospitalização. É especialmente crítica em países em desenvolvimento, onde representa um fator importante de mortalidade infantil (Carlson et al. 1978, Lynch et al. 2003, Parashar et al. 2003).

Admite-se que a estratégia principal para o controle dos *Rotavirus A* seja através da vacinação, mas para que ocorra uma prevenção efetiva, é preciso que haja o conhecimento dos genótipos G e P circulantes antes, durante e após o período de vacinação, também a identificação de genótipos não comuns ou não usuais, bem como infecções mistas, o que por certo tem reflexo importante em relação a uma determinada vacina, que esteja em uso. Adicionalmente, o conhecimento a respeito da idade da criança quando da sua infecção primária por *Rotavirus A*, em determinado tempo e localidade, constitui estratégia válida para o sucesso de um dado processo vacinal.

O Laboratório de Virologia do IPTSP/UFG vem desde a década de 80 realizando investigações que visam identificar vírus causadores de gastroenterite em populações infantil e adulta. Os resultados destes estudos indicam que nas crianças de até cinco anos de idade, *Rotavirus A* ocorre em todas as faixas etárias com pico maior de infecção até os 24 meses de idade e ainda com maior circulação na estação de seca regional (Cardoso et al. 1989, Camarota et al. 1992, Cardoso 1997, Souza 2001, Cardoso et al. 2003, Costa 2003, Souza et al. 2003, Andreasi 2004). Não obstante, não existem dados a respeito de que idade da criança se processa a infecção primária por este agente, antes da implementação vacinal. Assim, este estudo visa o preenchimento dessa lacuna do conhecimento com a compreensão de que a informação aqui obtida contribuirá também para subsidiar o processo de vacinação hoje em andamento no País.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Proceder a um estudo de seguimento durante o primeiro ano de vida visando detecção de *Rotavirus A* em amostras fecais de crianças nascidas em Goiânia-GO.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a faixa etária da primeira infecção por *Rotavirus A*;
- Observar o número de episódios diarréicos das crianças durante o período de estudo;
- Determinar a sazonalidade das infecções por *Rotavirus A*;
- Caracterizar as amostras de *Rotavirus A* quanto ao padrão eletroferotípico e genotipagem G e P.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL DE ESTUDO

O estudo foi realizado a partir de amostras fecais coletadas de crianças nascidas no Hospital Nossa Senhora de Lourdes – Goiânia-GO. Para o estudo contou-se com um total de 696 amostras fecais colhidas de 119 crianças.

As colheitas eram feitas a cada consulta médica no Hospital, as quais eram previamente agendadas, sendo que em cada colheita da amostra fecal, dados relativos à criança, considerando o seu quadro orgânico geral bem como o tempo de aleitamento materno, era questionado à mãe e complementado com as informações constantes do prontuário médico.

Do total de crianças estudadas, 34 foram seguidas por um período de um ano. Destas, de 26 crianças, a primeira colheita de fezes foi realizada logo após o nascimento, perfazendo um total de 14 amostras. De oito crianças, a primeira colheita foi realizada até 15 dias de nascimento e destas foram obtidas um total de 13 amostras. Das outras crianças foi obtido um número variável de amostras de acordo com o número de visitas médicas realizadas. O quadro 1 sumariza o número de crianças pelo número de amostras fecais coletadas.

Quadro 1 - Número de amostras fecais coletadas em relação às crianças estudadas.

Amostras coletadas	Crianças	Total amostras coletadas
n	n	N
1	32	32
2	19	38
3	12	36
4	5	20
5	7	35
6	4	24
7	5	35
8	1	8
13	8	104
14	26	364
Total	119	696

A colheita das amostras fecais procedeu-se no período de janeiro de 2004 a setembro de 2005. Considerando as 34 crianças no estudo de seguimento, 24 tiveram as amostras fecais coletadas em uma primeira etapa compreendendo o período de Janeiro de 2004 a Abril de 2005 (N = 334), enquanto as outras 10 foram coletadas em uma segunda etapa, Agosto de 2004 a Setembro de 2005 (N = 136), totalizando 470 amostras (Quadro 2). O quadro 3 mostra em detalhes o número de crianças analisadas por período de coleta.

Quadro 2 - Número de amostras fecais coletadas no estudo de seguimento em relação ao número de crianças estudadas.

Etapa	Nº de Amostras Fecais	Nº de Crianças
Janeiro / 2004 a Abril / 2005 – Primeira	334	24
Agosto / 2004 a Setembro / 2005 – Segunda	136	10
Total	470	34

Quadro 3 - Número de crianças estudadas em estudo de seguimento em relação ao período de coleta.

Período – Mês / Ano	Nº de Crianças
Janeiro / 2004 a Janeiro / 2005	03
Janeiro / 2004 a Fevereiro / 2005	02
Fevereiro / 2004 a Fevereiro / 2005	07
Fevereiro / 2004 a Março / 2005	03
Março / 2004 a Março / 2005	08
Março / 2004 a Abril / 2005	01
Agosto / 2004 a Agosto / 2005	03
Agosto / 2004 a Setembro / 2005	04
Setembro / 2004 a Setembro / 2005	03
Total	34

Todas as colheitas foram feitas mediante autorização prévia dos pais, com assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido devidamente aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (nº 090/2003) sendo este o critério único de inclusão no estudo.

4.3. METODOLOGIA

4.3.1. Detecção Viral

Todas as amostras fecais foram analisadas visando detecção de *Rotavirus A* através de duas metodologias: ensaio imunoenzimático combinado para rotavírus e adenovírus (EIERA) e eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA).

Inicialmente, para ambos os procedimentos, as amostras fecais eram processadas de maneira a se obter uma suspensão a 20,0% em PBS (tampão salina fosfato), pH 7,4 (0,14M NaCl; 0,02M KCl; 0,008M Na₂HPO₄ .12H₂O; 0,001M KH₂PO₄). A seguir eram clarificadas por centrifugação a 1.570 x g por 15 minutos, estocando-se o sobrenadante a -20°C até o uso.

4.3.1.1. EGPA

A EGPA foi feita seguindo descrição de Pereira et al. (1983). A extração do *dsRNA* viral foi feita utilizando o fenol/clorofórmio, seguida de precipitação com etanol absoluto/NaCl a 20,0% por, no mínimo, 18 horas a -20°C. A seguir, o *dsRNA* viral era re-suspenso em um tampão de amostra (0,0625M Tris/HCl, pH 6,8; 5M uréia; 2-mercaptoetanol 5,0%; duodecil sulfato de sódio 3,0%; azul de bromofenol 0,01%) e aplicado em gel de poliacrilamida em sistema descontínuo (gel concentrados a 3,5% e gel separador a 7,5%) o qual era então submetido a uma corrente elétrica de 40 mA por três a quatro horas. A seguir, procedia-se à revelação das bandas de *dsRNA* o qual consistiu inicialmente na fixação dos géis (etanol 10%; ácido acético 0,5%), seguido de coloração (0,011M nitrato de prata) e por fim na revelação (NaOH 3%; formalina 0,76%). A análise do bandejamento levava à classificação dos vírus detectados o que foi feita segundo o estabelecido por Lourenço et al. (1981).

4.3.1.2. EI ERA

O EI ERA foi desenvolvido utilizando-se *kits* preparados e cedidos pelo Laboratório de Reativos/Bio-Manguinhos/Fundação Oswaldo Cruz/Rio de Janeiro-RJ, e microplacas de polivinil (Hemobag-Produtos Cirúrgicos) ou de poliestireno (Corning). O ensaio é um procedimento de duplo sanduíche para detecção de antígeno para rotavírus do grupo A (Pereira et al. 1985). No ensaio os antígenos são captados em fase sólida por soros hiperimunes de cabra (imunizadas com rotavírus SA-11), detectados por soros hiperimunes de cobaias e revelados por soro de coelho anti-IgG de cobaia, conjugado à peroxidase. A leitura da reação foi feita visualmente e em espectrofotômetro (Behring EL 311s), utilizando-se filtro com comprimento de onda de

450 nm. Foram consideradas como amostras positivas para rotavírus aquelas que apresentaram densidade óptica (DO) igual ou maior que duas vezes em relação às densidades ópticas dos controles de conjugado e substrato, na presença de anticorpos de captura para rotavírus.

4.3.2. Genotipagem G e P de *Rotavirus A*

A determinação de genótipos de *Rotavirus A* foi feita pela reação em cadeia pela polimerase para detecção dos segmentos genômicos codificantes das proteínas VP4 (genótipos P) e VP7 (genótipos G).

4.3.2.1. Extração do *dsRNA* Viral

A extração foi feita a partir da suspensão fecal a 20%, utilizando o método descrito por Boom et al. (1990). Para o procedimento, em tubos tipo *ependorf* eram adicionados 400 microlitros (μL) da suspensão fecal e 1.000 μL de tampão L6 (GUSCN/Tris-HCL/EDTA) mais 15 μL de sílica. As suspensões eram então homogeneizadas em vórtex e incubadas sob agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. Após, procedia-se à centrifugação (14.000 x g por 1 minuto) e o sedimento era lavado por duas vezes com 1.000 μL de tampão L2 (GUSCN/Tris-HCl), para as quais também se procedia o item de centrifugação. A seguir, o material era ainda submetido a duas lavagens com 1.000 μL de etanol a 70% (gelado) e a uma lavagem com 1.000 μL de acetona (gelada), que igualmente eram seguidas de centrifugação. O sedimento era então incubado a 56°C por 15 minutos para evaporação e ressuspenso em 30 μL de água *Milli-Q* estéril. Após, o sedimento re-suspenso era agitado em vórtex

e incubado a 62°C por 15 minutos, seguido de centrifugação (14.000 x g por 3 minutos). Ao final, o sobrenadante era coletado e estocado a -20°C até o momento do uso.

4.3.2.2. Primeira Reação de Amplificação (*RT-PCR*)

A genotipagem G foi realizada seguindo protocolos descritos por Gouvea et al. (1990) modificado por Leite et al. (1996) e a P de acordo com Gentsch et al. (1992). Os iniciadores utilizados na genotipagem G e P estão relacionados no quadro 4.

Quadro 4 - Seqüência de iniciadores utilizados para a transcrição reversa do *dsRNA* viral - reação em cadeia pela polimerase (*RT-PCR*) para caracterização de genótipos G e P das amostras de *Rotavirus A* isoladas.

Iniciadores	Seqüência 5'-3'	Nucleotídeos	Tamanho (pb)
Genotipagem G			
9con1	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG	37-56	-
9con2	GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA	922-941	904
9T1-1 (G1)	TCT TGT CAA AGC AAA TAA TG	176-195	198
9T1-2 (G2)	GTT AGA AAT GAT TCT CCA CT	262-281	244
9T-3P (G3)	GTC CAG TTG CAG TGT TAG C	484-503	466
9T-4 (G4)	GGG TCG ATC GAA AAT TCT	423-440	403
FT5 (G5)	CAT GTA CTC GTT GTT ACG TC	760-779	742
HT8 (G8)	CGG TTC CGG A TT AGA CAC	256-273	274
9T-9B (G9)	TAT AAA GTC ATT GCA C	131-147	110
ET10 (G10)	TTC AGC CGT TGC GAT TC	679-714	715
Genotipagem P			
4con2	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	887-868	-
4con3	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	11-32	876
2T1 P[4]	CTA TG TTA GAG GTT AGA GTC	474-494	483
3T-1P[6]	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	259-278	267
1T1 P[8]	TCT ACT TGG GAT AAC GTG C	339-356	345
4T-1 P[9]	TGA GAC ATG CAA TTG GAC	385-402	391
5T-1P[10]	ATC ATA GTT AGT AGT CGG	575-594	583

Para obtenção do *cDNA*, inicialmente a 5µL do *dsRNA* era adicionado 3µL de DMSO (dimetilsulfóxido) seguindo desnaturação a 97°C por 5 minutos com posterior incubação em banho de gelo também por 5 minutos. Foi então adicionada a mistura de reação contendo as enzimas transcriptase reversa (SuperScript™ II RNase H– Reverse Transcriptase, Invitrogen™ Life Technologies) e Taq DNA polimerase (Taq DNA polimerase, Recombinant, Invitrogen™ Life Technologies). As amostras eram levadas ao termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal) e inicialmente incubadas a 42°C por 60 minutos para a obtenção do *cDNA*, utilizando-se os iniciadores consensuais 9con1/9con2 (genotipagem G) e 4con2/4con3 (genotipagem P), e após submetidas à amplificação através de ciclagem específica para a genotipagem G (Quadro 5) e P (Quadro 6).

Quadro 5 - Protocolo utilizado na reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (*RT-PCR*) para genotipagem G de *Rotavirus A* - Primeira amplificação.

Reagentes	Volume final 100 μ L
Tampão 10x (Tris-HCl/KCl – Life Technologies, Inc)	1 μ L
25 mM MgCl ₂ (Life Technologies, Inc)	8 μ L
Pool de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP (Life Technologies, Inc) – 10 mM	8 μ L
Iniciadores (pool 9con1/9con2) – 20 μ M cada	1 μ L
<i>Taq</i> -DNA polimerase – 2,5 U/mL	0,5 μ L
Transcriptase reversa – 200 U/mL	0,02 μ L
Ciclagem	T° e Tempo
Transcrição reversa (<i>cDNA</i>)	42°C / 30 min
Desnaturação inicial	99°C / 5 min
Amplificação – 25 ciclos	94°C / 1 min
	42°C / 2 min
	72°C / 1 min
Extensão	72°C / 7 min

Quadro 6 - Protocolo utilizado na reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (*RT-PCR*) para genotipagem P de *Rotavirus A* - Primeira amplificação.

Reagentes	Volume final 100 μ L
Tampão 10x (Tris-HCl/KCl – Life Technologies, Inc)	10 μ L
25 mM MgCl ₂ (Life Technologies, Inc)	8 μ L
Pool de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP (Life Technologies, Inc) – 10 mM	8 μ L
Iniciadores (pool 4con2/4con3) – 20 μ M	1 μ L

cada	
<i>Taq</i> -DNA polimerase – 2,5 U/mL	0,5 µL
Transcriptase reversa – 200 U/mL	0,02 µL
Ciclagem	T° e Tempo
Transcrição reversa (<i>cDNA</i>)	42°C / 60 min
Desnaturação inicial	99°C / 5 min
Amplificação – 30 ciclos	94°C / 1 min
	50°C / 2 min
	72°C / 2 min
Extensão	72°C / 7 min

4.3.2.3. Segunda Reação de Amplificação (*Nested-PCR*)

Os produtos obtidos da primeira amplificação (*RT-PCR*) foram então submetidos à reação de *nested-PCR*. Para esse procedimento foi adicionado à mistura de *nested-PCR*, a *Taq*-DNA polimerase, a mistura de iniciadores específicos para a identificação dos genótipos G1, G2, G3, G4, G5, G8, G9 e G10, bem como o iniciador consensual 9con1 e 1 µL do produto obtido da primeira amplificação (*RT-PCR*). A seguir, as amostras foram levadas ao termociclador e submetidas à ciclagem específica para a determinação dos genótipos G (Quadro 7).

Para a genotipagem P, o procedimento realizado foi semelhante ao da genotipagem G, diferindo em relação aos iniciadores específicos utilizados na amplificação para a identificação dos genótipos P[4], P[6], P[8], P[9] e P[10] e ao iniciador consensual 4con3, bem como na ciclagem específica para a determinação dos genótipos P (Quadro 8).

Quadro 7 - Protocolo utilizado na reação de *Nested-PCR* para genotipagem G de *Rotavirus A* - Segunda amplificação.

Reagentes	Volume final 100 μ L
Tampão 10x (Tris-HCl/KCl – Life Technologies, Inc)	10 μ L
25 mM MgCl ₂ (Life Technologies, Inc)	8 μ L
Pool de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP (Life Technologies, Inc) – 10 mM	8 μ L
Total Iniciadores (pool 9con1, G1-G5, G8-G10) – 20 μ M cada	1 μ L
<i>Taq</i> -DNA polimerase – 2,5 U/mL	0,5 μ L
Ciclagem	T° e Tempo
Amplificação – 15 ciclos	94°C / 1 min 42°C / 2 min 72°C / 1 min
Extensão	72°C / 7 min

Quadro 8 - Protocolo utilizado na reação de *Nested-PCR* para genotipagem P de *Rotavirus A* - Segunda amplificação.

Reagentes	Volume final 100 μ L
Tampão 10x (Tris-HCl/KCl – Life Technologies, Inc)	10 μ L
25 mM MgCl ₂ (Life Technologies, Inc)	8 μ L
Pool de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP (Life Technologies, Inc) – 10 mM	8 μ L

Total Iniciadores (pool 4con3, P4, P6, P8, P9, P10) – 20 µM cada	1 µL
Taq-DNA polimerase – 2,5 U/mL	0,5 µL
Ciclagem	T° e Tempo
Amplificação – 15 ciclos	94°C / 1 min
	42°C / 2 min
	72°C / 1 min
Extensão	72°C / 7 min

Em todas as reações de genotipagem foram utilizados como padrões positivos de genotipos de rotavírus as amostras DS-1 (genotipo G2-humano) e RV4 (genotipo P[8] humano) e como controle negativo água *Milli-Q* estéril.

Após a amplificação, 10 µL do produto obtido e 2 µL do padrão de peso molecular (100 *bp DNA ladder*), foram adicionados de 1 µL do tampão corante de amostras (azul de bromofenol, xileno cianol e glicerol) e aplicados em gel de agarose a 1,5% contendo 1 µg/mL de brometo de etídio e submetidos a uma corrente de 80 volts (V) em cuba horizontal contendo tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 0,5X.

Os géis foram então visualizados em transluminador com luz ultra-violeta e comparados com o padrão de peso molecular utilizado.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi feita utilizando o programa Epiinfo – versão 6.04d (CDC, Atlanta, GA) fixando-se em 5% (alfa igual a 0,05) o nível de rejeição da hipótese de nulidade, com intervalo de confiança de 95% (Seel & Torrie 1960, Vieira 1999, Monteiro Filho 2000).

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DAS CRIANÇAS ESTUDADAS

Das 119 crianças, 65 eram do gênero masculino e 54 do feminino e das 34 crianças seguidas por até um ano, 21 eram do gênero masculino e 13 do feminino (Tabela 1).

Tabela 1 - Características das crianças estudadas em relação ao gênero.

	Masculino		Feminino	
	Nº	%	Nº	%
Total de crianças estudadas (n=119)	65	(54,6)	54	(45,4)
Total de crianças seguidas (n=34)	21	(61,8)	13	(38,2)

Considerando a condição de sintomatologia das 119 crianças estudadas em relação à faixa etária os dados obtidos mostraram que 28 (23,5%) apresentaram à época do exame algum quadro clínico sendo que 15 (53,6%) delas se apresentaram com quadro de gastroenterite, dez (35,7%) com quadro respiratório e três (10,7%) com outros sintomas (obstipação intestinal, febre indiferenciada). A sintomatologia de gastroenterite apresentou-se em crianças de 3 a 9 meses de idade (Quadro 9).

Quadro 9 - Número de crianças com quadro clínico em relação à faixa etária considerando as 119 crianças estudadas.

Faixa etária	Gastroenterite	Sintoma respiratório	Outros
≤ 1 m	-	1	-
2 m	-	1	-
3 m	2	-	1
4 m	-	1	1
5 m	2	-	1
6 m	6	5	-
7 m	3	1	-
8 m	-	-	-
9 m	2	-	-
10 m	-	-	-
11 m	-	-	-

12 m	-	1	-
Total	15	10	3

Quando essa mesma análise foi feita em relação às 34 crianças do estudo de seguimento observou-se que 28 crianças com evidência clínica, 21 pertenciam a este seguimento e, no contexto, 12 apresentaram quadro de gastroenterite, oito tinham quadro respiratório e uma apresentava outro sintoma. Novamente, a faixa etária das crianças com quadro de gastroenterite foi de 3 a 9 meses de idade (Quadro 10).

Quadro 10 - Número de crianças do estudo de seguimento em relação ao quadro clínico por faixa etária.

Faixa etária	Gastroenterite	Sintoma respiratório	Outro
≤ 1 m	-	-	-
2 m	-	1	-
3 m	1	-	-
4 m	-	-	1
5 m	2	-	-
6 m	4	5	-
7m	3	1	-
8 m	-	-	-
9 m	2	-	-
10 m	-	-	-
11 m	-	-	-
12 m	-	1	-
Total	12	8	1

5.2. POSITIVIDADE PARA *ROTAVIRUS A*

Das 119 crianças estudadas, quatro (3,4%) apresentaram positividade para o *Rotavirus A*. Destas, três eram crianças do sexo masculino e uma do feminino (Tabela 2). Do total de crianças positivas, três (8,8%) pertenciam ao grupo do estudo de seguimento e a outra criança teve o seu seguimento interrompido aos três meses de idade, quando se apresentou positiva para o vírus (Tabela 3). Não houve diferença significativa considerando a positividade ao vírus em relação ao gênero para qualquer dos casos das crianças analisadas.

Tabela 2 - Positividade para *Rotavirus A* em crianças de 0 a 12 meses de idade em Goiânia-GO em relação ao gênero.

Gênero	Positivos/Total*	%
Masculino	3 / 65	4,6
Feminino	1 / 54	1,9
Total	4 / 119	3,4

*Teste exato de Fisher $p > 0,05$

Tabela 3 - Positividade para *Rotavirus A* em estudo de seguimento de crianças em Goiânia-GO em relação ao gênero.

Gênero	Positivos/Total*	%
Masculino	2 / 21	9,5
Feminino	1 / 13	7,7
Total	3 / 34	8,8

*Teste exato de Fisher $p > 0,05$

Do total de crianças estudadas, 15 apresentaram quadro de gastroenterite aguda e destas (20,0%) eram positivas para *Rotavirus A*. Ainda, destas 15 crianças, 12 eram do estudo de seguimento sendo que duas delas (12,7%) eram crianças positivas para o vírus.

Análise considerando a positividade ao vírus em relação ao mês de coleta das amostras mostrou que as quatro amostras positivas foram detectadas nos meses de janeiro, março, agosto e setembro. As amostras positivas resultantes das crianças do estudo de seguimento foram detectadas nos meses de janeiro, agosto e setembro (Tabela 4).

Tabela 4 - Positividade para *Rotavirus A* em relação ao mês de coleta - Janeiro de 2004 a Setembro de 2005.

Mês	Positivo/Total	%
Janeiro	1* / 71	1,4
Fevereiro	- / 77	-
Março	1 / 90	1,1
Abril	- / 50	-
Maio	- / 42	-
Junho	- / 39	-
Julho	- / 37	-
Agosto	1* / 73	1,3
Setembro	1* / 70	1,4
Outubro	- / 52	-
Novembro	- / 48	-
Dezembro	- / 47	-
Total	4 / 696	0,6

*Amostras do estudo de seguimento

Ainda, análise considerando o número de meses de aleitamento materno das crianças no estudo de seguimento que apresentaram positividade para *Rotavirus A*, mostrou que todas as 34 crianças foram amamentadas ao seio materno sendo que 13 delas ainda eram amamentadas ao final do estudo (12 meses). As três crianças positivas apresentaram a infecção aos cinco e seis meses de idade, na vigência da amamentação (Tabela 5), sendo uma assintomática e nenhuma necessitando de internação.

Tabela 5 - Positividade para *Rotavirus A* em relação ao número de meses de aleitamento materno, considerando as crianças em estudo de seguimento.

Tempo de amamentação	Positivos / Total	%
1 m	- / 3	-
5 m	2 / 5	40,0
6 m	1 / 3	33,3
8 m	- / 3	-
9 m	- / 4	-
10 m	- / 3	-
12m	- / 13	-
Total	3 / 34	8,8

O quadro 11 sumariza as informações referentes às quatro crianças positivas para *Rotavirus A*. Observa-se, como já referido, que três delas pertenciam ao estudo de seguimento e uma interrompeu o estudo aos três meses de idade, quando se apresentou positiva para o vírus. Das três crianças do estudo de seguimento, duas tiveram positividade aos cinco e uma aos seis meses de idade, na 7^a amostra fecal. Ambas apresentavam-se com quadro de gastroenterite quando da positividade para o vírus e ambas, embora negativas para o vírus, continuaram com o quadro de gastroenterite sendo uma delas até os seis meses de idade e a outra, apresentou a síndrome um mês antes da amostra positiva (aos cinco meses) e por mais dois episódios (aos sete e nove meses). Estas crianças apresentaram positividade nos meses de agosto e setembro/2004. A outra criança apresentou-se positiva aos cinco meses de idade, na 6^a amostra fecal e não apresentava quadro clínico quando se apresentou positiva para o vírus. A amostra foi detectada no mês de janeiro de 2005. Quanto à criança que não foi seguida por até

um ano, esta apresentou-se, como referido, positiva aos três meses de idade, na 3ª amostra fecal, possuía quadro de gastroenterite e a amostra positiva foi detectada no mês de março de 2005.

Quadro 11 - Características das crianças positivas para *Rotavirus A* em relação à faixa etária da criança quando da infecção, quadro clínico e número da amostra fecal positiva.

No. Registro	Amostra positiva				Meses com quadro de GE	Total de amostras coletadas	Amamentação (meses)
	Idade	Nº da amostra	Presença de GE	Data da coleta			
32411	5m	7ª	Sim	08/04	6	14	Sim (5m)
32432	6m	7ª	Sim	09/04	5, 7 e 9	14	Sim (10m)
32439	5m	6ª	Não	01/05	---	14	Sim (8m)
32484	3m	3ª	Sim	03/05	---	03	Sim (3m)

5.3. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA *ROTAVIRUS A*

Todas as quatro amostras positivas para *Rotavirus A* foram detectadas pelo EIERA, mas apenas duas foram positivas também pela EGPA sendo ambas com perfil eletroferotípico “bba”.

Nenhuma das amostras positivas pode ser genotipada seja para a especificidade em G ou em P.

6. DISCUSSÃO

A doença diarréica aguda permanece como um grande problema de saúde pública no mundo, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil, principalmente nos países em desenvolvimento sendo *Rotavirus A* considerado como o agente etiológico mais importante em todo o mundo (Bern et al. 1992).

No presente estudo foram consideradas inicialmente, 119 crianças cuja amostragem inicial procedeu-se ao nascimento, ou quando de sua primeira visita clínica, aos 15 dias de vida. Do total de crianças, 34 foram seguidas por até um ano de idade, o que permitiu uma análise prospectiva para a infecção por *Rotavirus A*.

Quando se procedeu à análise das 119 crianças em termos de quadro clínico apresentado, 15 apresentaram quadro de gastroenterite com 20,0% de positividade ao vírus, sendo que 12 delas pertencentes ao grupo de seguimento. Este dado remete para um índice de infecção gastrointestinal nas crianças seguimento de 35,3%, considerando apenas uma infecção por criança ao ano. Ao mesmo tempo, observa-se que o quadro clínico ocorreu nas crianças a partir dos três meses de idade, o que indica que uma vacina específica deve ser administrada muito precocemente na vida da criança o que tem sido considerado para a vacina em curso no Brasil (Ministério da Saúde 2005).

Admite-se que, em geral, a incidência da infecção sintomática por *Rotavirus A* assume maior expressão na faixa etária de 6 a 24 meses e que prevalece a forma inaparente entre recém nascidos e lactentes até os 3-4 meses, provavelmente como decorrência da proteção conferida pelos anticorpos de origem materna (Linhares et al. 1989, Bishop et al. 1996). No presente estudo, das 119 crianças estudadas, quatro (3,4%) foram positivas para *Rotavirus A* mas considerando o grupo de crianças em seguimento o coeficiente aumentou para 8,8%. Este índice pode ser considerado inferior aos detectados em outros estudos onde se observa índices que alcançam 27,8%, 69% e

até 85% (Brandt et al. 1983, Pérez-Schael et al. 1999, Barnes et al. 2002). Por outro lado deve ser lembrado que o índice de infecção neste tipo populacional pode variar, de acordo com a região, nível socioeconômico, período de realização dos estudos e duração da amamentação. Por outro lado se considerarmos o índice de positividade ao vírus nas crianças que apresentavam gastroenterite este é concordante aos demais da literatura.

Nas crianças seguimento infecção ocorreu aos 5 e 6 meses de idade, em suas 6^a e 7^a amostras, apesar de que outra criança, a que interrompeu o estudo, foi infectada aos 3 meses de idade em sua 3^a amostra. Os dados do nosso estudo assemelham-se em parte aos da literatura no que concerne à faixa etária de positividade viral a partir dos 6 meses de idade, e são concordantes a estudos prévios realizados em nossa Região (Cardoso et al. 1992, 2003; Costa et al. 2004). Não obstante, novamente, consideramos que este dado reforça a assertiva de que o processo de vacinação para *Rotavirus A* deva se dar muito cedo na vida da criança, o que poderá vir a evitar quadro grave de doença e disseminação da infecção pelo agente.

Considerando ainda a questão do quadro clínico gastroenterite foi observada que duas das crianças positivas apresentaram mais de um episódio da doença sendo que uma delas continuou com a doença por mais de mês e a outra apresentava a síndrome um mês antes da detecção viral na amostra e continuando com a doença por outros dois meses. Admite-se que a excreção principal de *Rotavirus A* ocorra preferencialmente até oito dias de doença muito embora excreção mais prolongada venha sendo descrita (Coulson et al. 1990). De qualquer modo, apesar da possibilidade de falsos negativos para o vírus, mesmo considerando o fato da utilização de duas metodologias de detecção, consideramos a necessidade de que outros enteropatógenos venham a ser pesquisados para definição da etiologia inclusive pelo fato de que *Rotavirus A* possa ser um agente propiciador da infecção para outros patógenos (Cardoso et al. 1992).

A terceira criança do estudo de seguimento positiva para *Rotavirus A* não apresentava quadro clínico à época da detecção viral e inclusive não apresentou qualquer sintoma em todo o tempo do seguimento. Criança com esse perfil pode ser considerada portadora sã com papel importante na manutenção do vírus na natureza inclusive pelo fato de que a amostra positiva foi detectada no mês de janeiro quando a infecção por *Rotavirus A* é extremamente baixa na Região (Cardoso et al. 1992, 2003). Quanto à quarta criança positiva, esta apresentava à época da infecção o quadro de gastroenterite, mas em função de sua interrupção no estudo não temos informações posteriores a respeito de seu quadro orgânico.

Embora não significativo, foi observado maior detecção de *Rotavirus A* nas crianças do gênero masculino. Índice maior de detecção do vírus em crianças do gênero masculino tem sido relatado (Chakravarti et al. 1992, Espinoza et al. 1997) embora outros autores não tenham observado diferença significativa na frequência entre os gêneros (Brandt et al. 1979, Pérez-Schael et al. 1999), o que concorda com o resultado do presente estudo, muito embora o pequeno número de crianças positivas.

Estudos mostram que em países de clima temperado, há maior ocorrência de *Rotavirus A* no inverno (Barnes 1998, Inouye et al. 2000), enquanto nas regiões de clima tropical (Nakata et al. 1999), inclusive nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (Linhares et al. 1989, Stewien et al. 1993), estes vírus ocorrem durante todo o ano. Por outro lado, na região Centro-Oeste do Brasil, em Goiânia-GO, o clima é subtropical, e tem sido observada sazonalidade para o agente no período de abril-agosto que corresponde ao período de seca na Região (Cardoso et al. 1992, 2003).

Neste estudo, das quatro amostras positivas, apenas uma foi detectada no período de maior incidência muito embora outras duas tenham sido detectadas nos meses limítrofes, março e setembro, o que pode sugerir, localmente, o início e término

do ciclo de *Rotavirus A*. Por outro lado, com já referido, uma amostra foi detectada no mês de janeiro, período de extrema escassez do agente na Região. De qualquer modo, o número de amostras positivas e de crianças seguidas prospectivamente é pequeno para que conclusões definitivas venham a ser aceites a respeito da mudança de sazonalidade para o vírus na Região.

Das quatro amostras positivas, duas foram detectadas pela EGPA e todas pelo EIERA. Consideramos que a negatividade das duas amostras negativas por EGPA possa ter ocorrido em função da não existência de vírus intacto na amostra fecal o que facilitaria a degradação do *dsRNA*, muito embora este seja mais resistente a nucleases que o *ssRNA* (Cardoso et al. 1992). Por outro lado, muito embora também a labilidade protéica, a VP6 que define antígeno de grupo para rotavírus, situa-se mais internamente e dessa forma pode estar mais preservada nas partículas com tripla camada.

As duas amostras positivas pela EGPA mostraram um mesmo padrão eletroferotípico (bbee). Estas eram padrão longo, condizente com amostra de subgrupo II e sorotipo/genotipo G1, G3, G4 (Espinoza et al. 1997). Adicionalmente estas foram detectadas nos meses de agosto e setembro de 2004, o que sugere fortemente um mesmo tipo de amostra circulante naquela população.

Nenhuma das quatro amostras positivas puderam ser genotipadas seja para genotipo G ou P. Se considerarmos que duas amostras eram EGPA negativas, podemos aceitar que não tivessem *dsRNA* íntegro que permitisse a amplificação e genotipagem. Por outro lado, duas amostras tinham o *dsRNA* visível à eletroforese e, dessa forma, a possibilidade é de que alguma substância inibidora não houvesse sido suficientemente retirada da suspensão fecal. Esta hipótese parece pouco plausível considerando o método de extração utilizado, que tem sido considerado ideal para extração e clarificação de ácido nucléico (Boom et al. 1990). Ademais, consideramos que, talvez,

alguma alteração genômica possa ter ocorrido no *dsRNA*, suficiente para o não reconhecimento pelos iniciadores utilizados nas reações de *RT-PCR* e *nested-PCR* (Gouvea et al. 1990, Gentsch et al. 1992, Das et al. 1994).

Como um todo, admitimos que os resultados do presente estudo somam-se ao conhecimento a respeito de *Rotavirus A* na região, no Brasil e no mundo e considerando o aspecto atual da prevenção para o agente entendemos que estes também sirvam de subsídios para o processo de vacinação em pauta.

7. CONCLUSÕES

- Nas condições do presente estudo, sugere-se que *Rotavirus A* faz infecção primária a partir de 3 meses de idade em crianças seguidas prospectivamente na cidade de Goiânia-GO;
- A infecção por *Rotavirus A* em crianças seguidas prospectivamente ocorreu em mais de um período do ano na Região;
- Pela EGPA duas amostras mostraram-se idênticas sugerindo uma mesma amostra circulante;
- A não genotipagem das amostras parece sugerir mudança nucleotídica no *dsRNA* viral o que não permitiu reconhecimento pelos iniciadores utilizados nas reações.
- Crianças seguidas prospectivamente mostraram mais de um episódio diarréico ao ano.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afrikanova I, Fabbretti E, Miozzo MC, Burrone OR 1998. Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. *J Gen Virol* 79: 2679–2686.

Albert MJ, Unicomb LE, Barnes GL, Bishop RF 1987. Cultivation and characterization of rotavirus strains infecting newborn babies in Melbourne, Australia, from 1975 to 1979. *J Clin Microbiol* 25: 1635-1640.

Al-Frayh AR, Ramia S, Bakir TMF, Zaidi MA 1987. Rotavirus shedding by neonates and possible modes of transmission. *J Trop Pediatr* 33: 246-248.

American Academy of Pediatrics 1998. Committee on Infectious Disease Prevention of rotavirus disease: guidelines for use of rotavirus vaccine. *Pediatrics* 102: 1483-1491.

Andreasi MSA 2004. *Rotavirus A em crianças de até 3 anos de idade, hospitalizadas com diarreia aguda, em Campo Grande-MS*. Dissertação [Mestrado em Ciências da Saúde] - Convênio Rede Centro-Oeste, Universidade de Brasília, Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, xiii + 89 pp.

Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK 1996. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* 272: 101-104.

Barnes G 2000. Invited Review. Rotavirus vaccine. *J Pediatr Gastr Nutr* 30: 12-17.

Barnes GL, Lund JS, Mitchell SV, De Bruyn L, Piggford L, Smith AL, Furmedge J, Masendycz PJ, Bugg HC, Bogdanovic-Sakran N, Carlin JB, Bishop RF 2002. Early phase II trial of human rotavirus vaccine candidate RV3. *Vaccine* 20: 2950-2956.

Bass DM, Mackow ER, Greenberg HB 1990. NS35 and not VP7 is the soluble rotavirus protein which binds to target cells. *J Virol* 64: 322-330.

Benatvala JE, Chrystie IL, Totterdell BM 1978. Rotaviral infections in human neonates. *J Am Vet Med Assoc* 173: 527-530.

Bern C, Martines J, de Zoysa I, Glass RI 1992. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: A ten-year update. *Bull World Health Organ* 70: 705–714.

Bern C, Glass R 1994. Impact of diarrheal diseases worldwide. In: Kapikian AZ (ed). *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*. Marcel Dekker, New York, p.1-26.

Bernstein DI, Ward RL 1998. Rotaviruses. In: Feigin RD, Cherry JD (eds). *Textbook of pediatric infectious diseases*. 4th ed. Philadelphia: Saunders, cap. 176, vol. 2, p.1901-1922.

Bernstein DI, Sack DA, Rothstein E, Reisinger K, Smith VE, O'Sullivan D, Spriggs DR, Ward RL 1999. Efficacy of live, attenuated, human rotavirus vaccine 89-12 in infants: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 354: 287-290.

Bernstein DI, Sack DA, Reisinger K, Rothstein E, Ward RL 2002. Second-year follow-up evaluation of live, attenuated human rotavirus vaccine 89-12 in healthy infants. *J Infect Dis* 186: 1487-1489.

Bican P, Cohen J, Charpilienne A, Scherrer R 1982. Purification and characterization of bovine rotavirus cores. *J Virol* 43:1113–1117.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2: 1281-1283.

Bishop RF 1993. Development of candidate rotavirus vaccines. *Vaccine* 11: 247-254.

Bishop RF, Bugg HC, Masendycz PJ, Lund JS, Gorrell RJ, Barnes GL 1996. Serum, fecal, and breast milk rotavirus antibodies as indices of infection in mother-infant pairs. *J Infect Dis* 174 (sup 1): 22-29.

Birch CJ, Lehmann NI, Hawker AJ, Marshall JA, Gust ID 1979. Comparison of electron microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay, solid-phase radioimmunoassay, and indirect immunofluorescence for detection of human rotavirus antigen in faeces. *J Clin Pathol* 32: 700-705.

Blacklow NR, Greenberg HB 1991. Viral gastroenteritis. *N Engl J Med* 325: 252-261.

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME, van der Noordaa J 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495-503.

Boyle JF, Holmes KV 1986. RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *J Virol* 58: 561-568.

Bresee JS, Glass RI, Ivanoff B, Gentsch JR 1999. Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation and implementation in developing countries. *Vaccine* 17: 2201-2222.

Brandt CD, Kim HW, Yolken RH, Kapikian AZ, Arrobio JO, Rodriguez WJ, Wyatt RG, Chanock RM, Parrot RH 1979. Comparative epidemiology of two rotavirus serotypes and other viral agents associated with pediatric gastroenteritis. *Am J Epidemiol* 110: 243-254.

Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Arrobio JO, Jeffries BC, Stallings EP, Lewis C, Miles AJ, Chanock RM, Kapikian AZ, Parrott RH 1983. Pediatric viral gastroenteritis during eight years of study. *J Clin Microbiol* 18: 71-78.

Burns JW, Greenberg HB, Shaw RD, Estes MK 1988. Functional and topographical analyses of epitopes on the hemagglutinin (VP4) of the simian rotavirus SA11. *J Virol* 62: 2164-2172.

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

Camarota SCT, Azevedo MSP, Martins RMR, Barbosa AJ, Ferreira PA Jr., Araújo SV, Cardoso DDP 1992. Ocorrência de rotavirus e adenovirus em crianças de até 11 anos de idade sem sintomatologia de diarreia em Goiânia-GO. *Rev Soc Bras Med Trop* 25: 31-35.

Cardoso DDP, Brito WMED, Martins RMB, Kitajima EW, Souza MPM, Barbosa AJ, Oliveira AS, Rascopi SB 1989. Ocorrência de rotavirus e adenovirus em amostras fecais de crianças com gastroenterite, na cidade de Goiânia. *Rev Soc Bras Med Trop* 22: 67-71.

Cardoso DDP, Martins RMB, Kitajima EW, Barbosa AJ, Camarota SC, Azevedo MS 1992. Rotavírus e adenovírus em crianças de 0-5 anos hospitalizadas com ou sem gastroenterite em Goiânia-GO, Brasil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 34: 433-439.

Cardoso DDP 1997. *Rotavírus em crianças de Goiânia, Goiás: caracterização das amostras de rotavírus do grupo A pela sorotipagem, subgrupagem e padrão eletroforético*. Tese [Doutorado em Ciências] – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 138 pp.

Cardoso DDP, Soares CMA, Azevedo MSP, Leite JPG, Munford V, Rácz ML 2000. Serotypes and subgroups of rotavirus isolated from children in Central Brazil. *J Health Popul Nutr* 18: 39-43.

Cardoso DDP, Soares CMA, Souza MBLDE, Azevedo MSP, Martins RMB, Queiroz DAO, Brito WMDE, Munford V, Racz ML 2003. Epidemiological features of Rotavirus infection in Goiânia, Brazil, from 1986 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 25-29.

Carlson JA, Middleton PJ, Szymanski MT, Huber J, Petric M 1978. Fatal rotavirus gastroenteritis: an analysis of 21 cases. *Am J Dis Child* 132: 477-479.

Centers For Disease Control and Prevention 1999a. Rotavirus vaccine for the prevention of rotavirus gastroenteritis among children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morbidity and Mortality Weekly Report* 48: 1-24.

Centers for Disease Control and Prevention 1999b. Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 48: 1007.

Chakravarti A, Kumar S, Mittal SK, Broor S 1992. Clinical and epidemiological features of acute gastroenteritis caused by human rotavirus subgroups. *J Diar Dis Res* 10: 21-24.

Chen D, Luongo CL, Nibert ML, Patton JT 1999. Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: Evidence that VP3 is a methyltransferase. *Virology* 265: 120-130.

Chiba S, Yokoyama T, Nakata S, et al 1986. Protective effect of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies. *Lancet* 2 (8504): 417-421.

Chizhikov V, Wagner M, Ivshina A, Hoshino Y, Kapikian AZ, Chumakov 2002. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol* 40: 2398-2407.

Ciarlet M, Liprandi F, Conner ME, Estes MK 2000. Species specificity and interspecies relatedness of NSP4 genetic groups by comparative NSP4 sequence analyses of animal rotaviruses. *Arch Virol* 145: 371–383.

Ciarlet M, Crawford SF, Estes MK 2001. Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains. *J Virol* 75: 11834-50.

Ciarlet M, Estes MK 2001. Interactions between rotavirus and gastrointestinal cells. *Curr Opin Microbiol* 4: 435-441.

Ciarlet M, Crawford SE, Cheng E, Blutt SE, Rice DA, Bergelson JM, Estes MK 2002. VLA-2 ($\alpha 2\beta 1$) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment. *J Virol* 76: 1109-1123.

Clark HF, Offit PA, Ellis RW, Eiden JJ, Krah D, Shaw AR, Pichichero M, Treanor JJ, Borian FE, Bell LM, Plotkin SA 1996. The development of multivalent bovine rotavirus (strain WC#) reassortant vaccine for infants. *J Infect Dis* 174 (sup 1): 73-80.

Clemens JD, Ahmed M, Butler T, Greenough III WB, Sack DA, Stanton BF 1983. Rotavirus diarrhoea: an expanding clinical spectrum. *J Trop Med Hyg* 83: 117-122.

Clements-Mann ML, Dudas R, Hoshino Y, Nehring P, Sperber E, Wagner M, Stephens I, Karron R, Deforest A, Kapikian AZ 2001. Safety and immunogenicity of live attenuated quadrivalent human-bovine (UK) reassortant rotavirus vaccine administered with childhood vaccines to infants. *Vaccine* 19: 4676-4684.

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

Conner ME, Estes MK, Graham DY 1988. Rabbit model of rotavirus infection. *J Virol* 62:1625–1633.

Costa PSS 2003. Estudo prospectivo da doença diarreica por rotavirus do grupo A em crianças de Goiânia-Goiás: genotipagem e evolução clínico-laboratorial. Tese [Doutorado em Medicina/Pediatria] – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 127 pp.

Costa PSS, Grisi SJFE, Cardoso DPP, Fiaccadori FS, Souza MBLD, Santos RAT 2004. Manifestações clínicas e epidemiológicas das infecções por *Rotavirus A*. *Pediatrics (São Paulo)* 26: 151-158.

Coulson BS, Fowler KJ, Bishop RF, Cotton RG 1985. Neutralizing monoclonal antibodies to human rotavirus and indications of antigenic drift among strains from neonates. *J Virol* 54: 14-20.

Coulson BS, Grimwood K, Masendycz PJ, et al. 1990. Comparison of rotavirus immunoglobulin A coproconversion with other indices of rotavirus infection in a longitudinal study in childhood. *J Clin Microbiol* 28: 1367-1374.

Coulson BS 1996. VP4 and VP7 typing using monoclonal antibodies. *Arch Virol Suppl* 12: 113-118.

Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ 1997. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5389-5394.

Crawford SE, Mukherjee SK, Estes MK, Lawton JA, Shaw AL, Ramig RF, Venkataram Prasad BV 2001. Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *J Virol* 75: 6052-6061.

Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, Kumar R, Bham MK, Glass RI 1994. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol* 32: 1820-1822.

De Zoysa I, Feachem RG 1985. Interventions for the control of diarrhea diseases among young children: rotavirus and cholera immunization. *Bulletin of the World Health Organization* 63: 569-583.

Dennehy PH 2000. Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home. *Pediatr Infect Dis J* 19: 103-105.

Deo RC, Groft CM, Rajashankar KR, Burley SK 2002. Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer. *Cell* 108: 71-81.

Desselberger U 2000. Rotaviruses: basic facts. In: Gray J and Desselberger U (eds.). *Rotaviruses: methods and protocols*, ed. Human Press, New Jersey, p.1-8.

Dong Y, Zeng CQ, Ball JM, Estes MK, Morris AP 1997. The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3960–3965.

Estes MK, Crawford SE, Penaranda ME, Petrie BL, Burns JW, Chan WK, Ericson B, Smith GE, Summers MD 1987. Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. *J Virol* 61:1488-1494.

Estes MK, Cohen J 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Ver* 53: 410-449.

Estes, MK 2001. Rotaviruses and their replication. In: Knipe DM and Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Strais SE (eds.). *Fields Virology*. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.1747-1785.

Espinoza F, Paniagua M, Hallander H, Hedlund K, Svensson L 1997. Prevalence and characteristics of severe rotavirus infections in Nicaraguan children. *Annals of Tropical Paediatrics* 17: 25-32.

Fernandez J, Sandino A, Yudelevich A, Avendano LF, Venegas A, Hinrichsen V, Spencer E 1992. Rotavirus detection by dot blot hybridization assay using a non-radioactive synthetic oligodeoxynucleotide probe. *Epidemiol Infect* 108: 175–184.

Fischer TK, Page NA, Griffin DD, Eugen-Olsen J, Pedersen AG, Valentine-Branth P, Molbak K, Sommerfelt H, Nielsen NM 2003. Characterization of incompletely typed rotavirus strains from Guinea-Bissau: identification of G8 and G9 types and a high frequency of mixed infections. *Virology* 311: 125-133.

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

Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Morris CA 1975. Epidemic viral enteritis in a long-stay children's Ward. *Lancet* 1: 4-5.

Flores J, Pérez-Schael I, González M, Garcia D, Perez M, Doua N, Cunto W, Chanock RM, Kapikian AZ 1987. Protection against severe rotavirus diarrhoea by rhesus rotavirus vaccine in venezuelan infants. *Lancet* 8538: 882-884.

Flores J, Green KY, Garcia D, Sears J, Perez-Shael I, Avendano LF, Rodriguez WB, Taniguchi K, Urasawa S, Kapikian AZ 1989. Dot Hybridization assay for distinction of rotavirus serotypes. *J Clin Microbiol* 27: 29-34.

Friedman MG, Galil A, Sarov B, Margalith M, Katzir G, Midthun K, Taniguchi K, Urasawa S, Kapikian AZ, Edelman R, Sarov I 1988. Two sequential outbreaks of rotavirus gastroenteritis: evidence for symptomatic and asymptomatic reinfections. *J Infect Dis* 158: 814-822.

Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bham MK 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 1365-1373.

Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JPG, Alfieri A, Kumar R, Bhan MK, Glass RI 1996. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: Implications for vaccine development. *J Infect Dis* 174 (sup 1): 30-36.

Glass RI 1996. The epidemiology of rotavirus diarrhea in the United States: surveillance and estimates of disease burden. *J Infect Dis* 174 (sup 1): 5-11.

Gombold JL, Estes MK, Ramig RF 1985. Assignment of simian rotavirus SA11 temperature-sensitive mutant groups B and E to genome segments. *Virology* 143: 309-320.

Gomes TA, Rassi V, McDonald KL, Ramos SRTS, Trabulsi LR, Vieira MA, Guth BEC, Candeias JAN, Ivey C, Toledo M, Blake P 1991. Enteropatogens associated with acute diarrheal diseases in urban infants in São Paulo, Brazil. *J Infect Dis* 164: 331-337.

González RA, Torres-Vega MA, López S, Arias CF 1998. In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Arch Virol* 143: 981-996.

Gorziglia MI, Larrea C, Liprandi F, Esparza J 1985. Biochemical evidence for the oligomeric (possibly trimeric) structure of the major inner capsid polypeptide (45K) of rotaviruses. *J Gen Virol* 66: 1889-1900.

Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Zhao-Yin F 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 28: 276-282.

Gouvea V, Allen JR, Glass RI, Fang ZY, Bremont M, Cohen J, McCrae MA, Saif J, Sinarachatanant P, Caul ED 1991. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29: 519-523.

Gouvea V, Ramirez C, Li B, Santos N, Saif L, Clark HF, Hoshino Y 1993. Restriction endonuclease analysis of the vp7 genes of human and animal rotaviruses. *J Clin Microbiol* 31: 917-923.

Gouvea V, Castro L, Timenetsky MC, Greenberg H, Santos N 1994. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. *J Clin Microbiol* 32: 1408-1409.

Greenberg HB, Valdesuso J, van Wyke K, Midthun K, Walsh M, McAuliffe V, Wyatt RG, Kalica AR, Flores J, Hoshino Y 1983a. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J Virol* 47: 267-275.

Greenberg HB, Flores J, Kalica AR, Wyatt RG, Jones R 1983b. Gene coding assignments for growth restriction, neutralization and subgroup specificities of the W and DS-1 strains of human rotavirus. *J Gen Virol* 64: 313-320.

Greenberg HB, McAuliffe V, Valdesuso J, Wyatt R, Flores J, Kalica A, Hoshino Y, Singh N 1983c. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect Immun* 39: 91-99.

Groft CM, Burley SK 2002. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol Cell* 9: 1273-1283.

Gunasena S, Nakagomi O, Isegawa Y, Kaga E, Nakagomi T, Steele AD, Flores J, Ueda S 1993. Relative frequency of VP4 gene alleles among human rotaviruses recovered over a 10-year period (1982-1991) from Japanese Children with diarrhea. *J Clin Microbiol* 31: 2195-2197.

Guerrero CA, Mendez E, Zarate S, Isa P, Lopez S, Arias CF 2000. Integrin $\alpha v \beta 3$ mediates rotavirus cell entry. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14644-14649.

Gurwith M, Wenman W, Hinde D, Feltham S, Greenberg H 1981. A prospective study of rotavirus infection in infants and young children. *J Infect Dis* 144: 218-224.

Hasegawa A, Matsuno S, Inouye S, et al 1982. Isolation of human rotaviruses in primary cultures of monkey kidney cells. *J Clin Microbiol* 16: 387-390.

Hewish MJ, Takada Y, Coulson BS 2000. Integrins $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 4\beta 1$ can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J Virol* 74: 228-236.

Hoshino Y, Sereno MM, Midthun K, Flores J, Kapikian AZ, Chanock RM 1985. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8701-8704.

Hoshino Y, Saif LJ, Sereno MM, Chanock RM, Kapikian AZ 1988. Infection immunity of piglets to either VP3 or VP7 outer capsid protein confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. *J Virol* 62: 744-748.

Hoshino Y, Kapikian AZ 1996. Classification of rotavirus VP4 and VP7 serotypes. *Arch Virol (Sup 12)*: 99-111.

Hoshino Y, Kapikian AZ 2000. Rotavirus serotypes: Classification and importance in rotavirus epidemiology, immunity and vaccine development. *J Health Popul Nutr* 18: 5-14.

Hoshino Y, Jones RW, Kapikian AZ 2002. Characterization of neutralization specificities of outer capsid spike protein VP4 of selected murine, lapine, and human rotavirus strains. *Virology* 299: 64-67.

Hua J, Patton JT 1994. The carboxyl-half of the rotavirus nonstructural protein NS53 (NSP1) is not required for virus replication. *Virology* 198: 567-576.

ICTVdB Index of Viruses 2005. 00.060. Reoviridae In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J Desselberger U, Ball LA (eds). *Virus Taxonomy, 8th Reports of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, Academic Press, 1162pp. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>>. Acesso em: 02 ago. 2006.

ICTVdB Management 2006. 00.012. Caliciviridae. In: Büchen-Osmond C. (ed). *ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3*. Columbia University, New York, USA. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>>. Acesso em: 18 jul. 2006.

Informe Técnico Institucional 2006. Vacina contra rotavírus. *Rev Saúde Pública* 40: 355-358.

Iizuka M, Chiba M, Masamune O, Gerna G, Nakagomi O 1993. Molecular characterization of human rotavirus VP4 genes by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay. *Microbiol Immunol* 37: 729-735.

Ito H, Sugiyama M, Masubuchi Y, Mori Y, Minamoto N 2001. Complete nucleotide sequence of a group A avian rotavirus genome and a comparison with its counterparts of mammalian rotaviruses. *Virus Res* 75: 123-38.

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

Inouye S, Yamashita K, Yamadera S, Yoshikawa M, Kato N, Okabe N 2000. Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents. *The J Infect Dis* 181 (sup 2): 270-274.

Jagannath MR, Vethanayagam RR, Reddy BSY, Raman S, Rao CD 2000. Characterization of human symptomatic rotavirus isolates MP409 and MP480 having 'long' RNA electropherotype and subgroup I specificity, highly related to the P6[1],G8 type bovine rotavirus A5, from Mysore, India. *Arch Virol* 145: 1339-1357.

Jayaram H, Estes MK, Prasad BVV 2004. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Research* 101: 67-81.

Kaljot KT, Shaw RD, Rubin DH, Greenberg HB 1988. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol* 62: 1136-1144.

Kalica AR, Greenberg HB, Wyatt RG, Flores J, Sereno MM, Kapikian AZ, Chanock RM 1981. Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. *Virology* 112: 385-390.

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

Kapahnke R, Rappold W, Desselberger U, Riesner D 1986. The stiffness of dsRNA: Hydrodynamic studies on fluorescence- labelled RNA segments of bovine rotavirus. *Nucleic Acids Res* 14: 3215-3228.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 10: 1075-1081.

Kapikian AZ 1996. Overview of viral gastroenteritis. *Arch Virol* 12: 7-9.

Kapikian AZ 1997. Viral gastroenteritis. In: Evans A, Kaslow R (eds.). *Viral Infections of Humans*. Plenum Press, New York, p.293-340.

Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM 2001. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Strais SE (eds.). *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.1787-1833.

Kattoura MD, Clapp LL, Patton JT 1992. The rotavirus nonstructural protein, NS35, possesses RNA-binding activity in vitro and in vivo. *Virology* 191: 698-708.

Kirkwood CD, Coulson BS, Bishop RF 1996. G3P2 rotaviruses causing diarrheal disease in neonates differ in VP4, VP7, and NSP4 sequence from G3P2 strains causing asymptomatic neonatal infection. *Arch Virol* 141: 1661-1676.

Kobayashi N, Taniguchi K, Urasawa S 1990. Identification of operationally overlapping and independent cross-reactive neutralization regions on human rotavirus VP4. *J Gen Virol* 71: 261.

Labbe M, Baudoux P, Charpilienne A, Poncet D, Cohen J 1994. Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein. *J Gen Virol* 75: 3423-3430.

Larralde G, Flores J 1990. Identification of gene 4 alleles among human rotaviruses by polymerase chain reaction-derived probes. *Virology* 179: 469-473.

Leite JPG, Alfieri AA, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR 1996. Rotavirus G and P types in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch Virol* 141: 2365-2374.

Linhares AC, Gabbay YB, Freitas RB, Da Rosa EST, Mascarenhas JD, Loureiro ECB 1989. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. *Epidemiol Infect* 102: 129-145.

Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JDP, Freitas RB, Oliveira CS, Bellesi N, Monteiro TF, Lins-Lainson Z, Ramos FLP, Valente AS 1994. Estudo prospectivo das infecções por rotavírus em Belém, Pará, Brasil: uma abordagem clínico-epidemiológica. *Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)* 70: 220-225.

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

Linhares AC, Bresee JS 2000. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. *Rev Panam Salud Publica* 8: 305-331.

Linhares AC, Mascarenhas JDP, Gusmão RH, Gabbay YB, Fialho AM, Leite JPG 2002. Neonatal rotavirus infection in Belém, northern Brazil: nosocomial transmission of a P[6]G2 strain. *J Med Virol* 67: 418-426.

Liprandi F, Gerder M, Bastidas Z, Lopez JA, Pujol FH, Ludert JE, Joelsson DB, Ciarlet M 2003. A novel type of VP4 carried by a porcine rotavirus strain. *Virology* 315: 373-380.

Liu M, Offit PA, Estes MK 1988. Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology* 163: 26-32.

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

Ludert JE, Feng N, Yu JH, Broome RL, Hoshino Y, Geenberg HB 1996. Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein *in vitro* and *in vivo*. *J Virol* 70: 487-493.

Lundgren O, Peregrin AT, Persson K, Kordasti S, Uhnöo I, Svensson L 2000. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science* 287: 491-495.

Lynch M, Shieh WJ, Tatti K, Gentsch JR, Ferebee-Harris T, Jiang B, Guarner J, Bresee JS, Grenwald M, Cullen S, Davies HD, Trevenen C, Zaki SR, Glass RI 2003. The pathology of rotavirus-associated deaths, using new molecular diagnostics. *Clin Infect Dis* 37: 1327-1333.

Madeley CR, Cosgrove BP 1975. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 2: 451-2.

Martella V, Ciarlet M, Camarda A, Pratelli A, Tempesta M, Greco G, Cavalli A, Elia G, Decaro N, Terio V, Bozzo G, Camero M, Buonavoglia C 2003. Molecular characterization of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 genes of lapine rotaviruses identified in Italy: emergence of a novel VP4 genotype. *Virology* 314: 358-370.

Masendycz P, Bogdanovic-Sakran N, Kirkwood C, Bishop R, Barnes G 2001. Report of the Australian rotavirus surveillance program, 2000/2001. *Communicable Diseases Intelligence*, Melbourne, v. 25, n. 3, p. 143-146.

Mata L, Simhon A, Urrutia JJ, Kronmal RA, Fernández R, García B 1983. Epidemiology of rotavirus in cohort of 45 Guatemalan Mayan Indian children observed from birth to the age of three years. *J Infect Dis* 148: 452-461.

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

Mattion NM, Cohen J, Estes MK 1994. The rotavirus proteins. In: Kapikian A (ed.). *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*. Marcel Dekker, New York, p.169-249.

McNeal MM, Sestak K, Choi AH, Basu M, Cole MJ, Aye PP, Bohm RP, Ward RL 2005. Development of a rotavirus-shedding model in rhesus macaques, using a homologous wild-type rotavirus of a new P genotype. *J Virol* 79: 944-954.

Mertens PPC, Arella M, Attoui H, Belloncik S, Bergoin M, Boccardo G, Booth TF, Chiu W, Diprose JM, Duncan R and 34 others 2000. Family *Reoviridae*. In: *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, p.395-480. Edited by Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. Academic Press, San Diego.

Miller MA, McCann L 2001. Policy analysis of the use of hepatitis B, Haemophilus influenzae type b-, Streptococcus pneumoniae-conjugate and rotavirus vaccines in national immunization schedules. *Health Econ* 9: 19-35.

Ministério da Saúde 2005. Informe Técnico. In: *Doença diarreica por rotavírus: Vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus – VORH – versão preliminar*. Documento elaborado pela COVET/CGDT e CGPNI do DEVEP/SVS/MS, Brasília, Distrito Federal, 27pp.

Monteiro Filho, G 2000. Descrição de outros testes não paramétricos. *Estatística prática para ciências biológicas*. 2. ed. Ed. Vieira, Goiânia, p. 209-221.

Mori Y, Borgan MA, Ito N, Sugiyama M, Minamoto N 2002. Diarrhoeal inducing activity of avian rotavirus NSP4 glycoproteins, which differ greatly from mammalian rotavirus NSP4 glycoproteins in deduced amino acid sequences, in suckling mice. *J Virol* 76: 5829-5834.

Morris AP, Scott JK, Ball JM, Zeng CQ, O'Neal WK, Estes MK 1999. NSP4 elicits age-dependent diarrhea and Ca(2+)mediated I(-) influx into intestinal crypts of CF mice. *Am J Physiol* 277: 431-444.

Moulton LH, Staat MA, Santosham M, Ward RL 1998. The protective effectiveness of natural rotavirus infection in an American Indian population. *J Infect Dis* 178: 1562-1566.

Murray CJ, Lopez AD 1997. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden Study. *Lancet* 349: 1269-1276.

Nakagomi O, Isegawa Y, Ward RL, Knowlton DR, Kaga E, Nakagomi T, Ueda S 1994. Naturally occurring dual infection with human and bovine rotaviruses as suggested by recovery of G1P8 and G1P5 rotavirus from a single patient. *Ach Virol* 137: 381-388.

Nakata S, Gatheru Z, Ukae S, Adachi N, Kobayashi N, Honma S, Muli J, Ogaja P, Nyangao J, Kiplagat E, Tukei PM, Chiba S 1999. Epidemiological study of the G serotype distribution of group A rotaviruses in Kenya from 1991 to 1994. *J Med Virol* 58: 296-303.

Offit PA, Blavat G 1986. Identification of the two rotavirus genes determining neutralization specificities. *J Virol* 57: 376-378.

Offit PA, Shaw RD, Greenberg HB 1986. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins VP3 and VP7. *J Virol* 58: 700-703.

Offit PA 2002. The future of rotavirus vaccines. *Semin Pediatr Infect Dis* 13: 190-195.

Okada J, Urasawa T, Kobayashi N, Taniguchi K, Hasegawa A, Mise K, Urasawa S 2000. New P serotype of group A human rotavirus closely related to that of a porcine rotavirus. *J Med Virol* 60: 63-69.

O’Ryan MO, Matson DO, Estes MK, Bartlett AV, Pickering LK 1990. Molecular epidemiology of rotavirus in children attending day care centers in Houston. *J Infect Dis* 162: 810-816.

Padilla-Noriega L, Dunn SJ, Lopez S, Greenberg HB, Arias CF 1995. Identification of two independent neutralization domains on the VP4 trypsin cleavage products VP5* and VP8* of human rotavirus ST3. *Virology* 206: 148-154.

Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI 1998. Rotavirus. *Emerg Infect Dis* 4: 561-570.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 9: 565-572.

Patton JT, Gallegos CO 1990. Rotavirus RNA replication: single-stranded RNA extends from the replicase particle. *J Gen Virol* 71: 1087-1094.

Patton JT, Salter-Cid L, Kalbach A, Mansell EA, Kattoura M 1993. Nucleotide and amino acid sequence analysis of the rotavirus nonstructural RNA-binding protein NS35. *Virology* 192: 438-446.

Patton JT, Chen D 1999. RNA-binding and capping activities of proteins in rotavirus open cores. *J Virol* 73:1382-1391.

Pereira HG, Leite JPG, Azeredo RS, Farias V, Sutmoller F 1983. An atypical rotavirus detected in a child with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 78: 245-250.

Pereira HG, Linhares AC, Candeias JAN, Glass RI 1993. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. *Rev Panam Salud Publica* 27: 224-33.

Pérez-Schael I, González R, Fernández R, Alfonso E, Inaty D, Boher Y, Sarmiento L 1999. Epidemiological features of rotavirus infection in Caracas, Venezuela: implications for rotavirus immunization programs. *J Med Virol* 59: 520-526.

Pesavento JP, Billingsley AM, Roberts EJ, Ramig RF, Prasad BV 2003. Structures of rotavirus reassortants demonstrate correlation of altered conformation of the VP4 spike and expression of unexpected VP4-associated phenotypes. *J Virol* 77: 3291-3296.

Petrie BL, Greenberg HB, Graham DY, Estes MK 1984. Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus Res* 1: 133-152.

Piron M, Vende P, Cohen J, Poncet D 1998. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J* 17: 5811-5821.

Pizarro JM, Pizarro JL, Fernandez J, Sandino AM, Spencer E 1991. Effect of nucleotide analogues on rotavirus transcription and replication. *Virology* 184: 768-772.

Poncet D, Aponte C, Cohen J 1993. Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *J Virol* 67: 3159-3165.

Poncet D, Lindenbaum P, L'Haridon R, Cohen J 1997. In vivo and in vitro phosphorylation of rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasm. *J Virol* 71: 34-41.

Prasad BVV, Burns JW, Marietta E, Estes MK, Chiu W 1990. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature* 343: 476-479.

Prasad BVV, Chiu W 1994. Structure of rotaviruses. In: Ramig RF (ed.). *Rotaviruses*. Springer-Verlag, Berlin, p. 9-29.

Prasad BVV, Estes MK 1997. Molecular basis of rotavirus replication. In: Chiu W, Burnet RM, Garcea RL. *Structural biology of viruses*. 1th ed. Oxford University Press, Oxford, p. 239-268.

Rahman M, Matthijnssens J, Nahar S, Podder G, Sack DA, Azim T, Van Ranst M 2005. Characterization of a novel P[25],G11 human group A rotavirus. *J Clin Microbiol* 43: 208-212.

Ramachandran M, Das BK, Vij A, Kumar R, Bhambai SS, Kesari N, Rawat H, Bahl L, Thakur S, Woods PA, Glass RI, Bhan MK, Gentsch JR 1996. Unusual diversity of human rotavirus G and P genotypes in India. *J Clin Microbiol* 34: 436-439.

Ramig RF, Petrie BL 1984. Characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11: Protein synthesis and morphogenesis. *J Virol* 49: 665-673.

Rao CD, Gowda K, Yugandar Reddy BS 2000. Sequence analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotaviruses. *Virology* 276:104-113.

Riepenhoff-Talty M, Bogger-Goren S, Li P, Carmody PJ, Barret HJ, Ogra PL 1981. Development of serum and intestinal antibody response to rotavirus after naturally acquired rotavirus infection in man. *J Med Virol* 8: 215-222.

Rixon F, Taylor P, Desselberger U 1984. Rotavirus RNA segments sized by electron microscopy. *J Gen Virol* 65: 233-239.

Rodriguez WJ, Kim HW, Arrobio JO, Brandt CD, Chanock RM, Kapikian AZ, Wyatt RG, Parrott RH 1977. Clinical features of acute gastroenteritis associated with human reovirus-like agent in infants and young children. *J Pediatr* 91: 188-193.

Ruuska T, Vesikari T 1991. A prospective study of acute diarrhea in Finnish children from birth to 2 ½ years of age. *Acta Paediatr* 80: 500-507.

Sabara M, Gilchris JE, Hudson GR, Babiuk LA 1985. Preliminary characterization of an epitope involved in neutralization and cell attachment that is located on the major bovine rotavirus glycoprotein. *J Virol* 53: 58-66.

Sabara M, Ready KF, Frenchick PJ, Babiuk LA 1987. Biochemical evidence for the oligomeric arrangement of bovine rotavirus nucleocapsid protein and its possible significance in the immunogenicity of this protein. *J Gen Virol* 68: 123-133.

Sanekata T, Yoshida Y, Okada H 1981. Detection of rotavirus in faeces by latex agglutination. *J Immunol Methods* 41: 377-385.

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

Seel RGD, Torrie JH, et al 1960. Analysis of variance I: the one way classification. In: Seel RGD; Torrie JH (eds). *Principles and procedures of statistics*. McGraw-Hill, New York, p. 99-131.

Shaw AL, Rothnagel R, Chen D, Ramig RF, Chiu W, Prasad BV 1993. Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. *Cell* 74: 693-701.

Souza MBLD 2001. *Caracterização sorológica e molecular de amostras de Rotavírus A provenientes de amostras fecais de crianças com gastroenterite aguda em Goiânia-GO*. Dissertação [Mestrado em Microbiologia] – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, xii + 111 pp.

Souza MBLD, Racz ML, Leite JPG, Soares CMA, Martins RMB, Munford V, Cardoso DDP 2003. Molecular and serological characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Goiânia, Brazil, 1998-2000. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 441-443.

Stewien KE, Durigon EL, Tanaka H, Gilio AE 1991. Ocorrência de astrovírus humanos na cidade de São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica* 25: 157-158.

Stewien KE, Mos EN, Yanaguita RM, Jerez JA, Durigon EL, Harsi CM, Tanaka H, Moraes RM, Silva LA, Santos MA 1993. Viral, bacterial and parasitic pathogens associated with severe diarrhoea in the city of São Paulo, Brazil. *J Diarrhoeal Dis Res* 11: 148-52.

Svensson L, Sheshberadaran H, Vene S, Norrby E, Grandien M, Wadell G 1987. Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. *J Gen Virol* 68: 643-651.

Svensson L, Finlay B, Bass D, von Bonsdorff CH, Greenberg HB 1991. Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Virol* 65: 4190-4197.

Taniguchi K, Urasawa S, Urasawa T 1985. Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. *J Gen Virol* 66: 1045-1053.

Taraporewala Z, Chen D, Patton J 1999. Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *J Virol* 73: 9934-9943.

Taraporewala Z, Patton J 2001. Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2. *J Virol* 75: 4519-4527.

Taraporewala Z, Patton J 2004. Nonstructural protein involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus Res* 101: 57-66.

Tian P, Estes MK, Hu Y, Ball JM, Zeng CQY, Schilling WP 1995. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum. *J Virol* 69: 5763-5772.

Tian P, Ball JM, Zeng CQ, Estes MK 1996. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity. *J Virol* 70: 6973-6981.

Toporovski MS, Toporovski J 1987. Diarréia aguda por rotavirus – estudo de 109 casos. *Pediatrics (São Paulo)* 9: 22-26.

Torres-Vega MA, Gonzalez RA, Duarte M, Poncet D, Lopez S, Arias CF 2000. The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J Gen Virol* 81: 821-830.

Uhnoo I, Olding-Stenkvis E, Kreuger A 1986. Clinical features of acute gastroenteritis associated with rotavirus, enteric adenovirus, and bacteria. *Arch Dis Child* 61: 732-738.

van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner 2000. Family *Reoviridae*. In: Virus taxonomy. *Classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses*. Academic Press, San Diego, p. 395-433.

Tiemessen CT, Wegerhoff FO, Erasmus MJ, Kidd AH 1989. Infection by enteric adenoviruses, rotaviruses and other agents in a rural African environment. *J Med Virol* 28: 176-182.

Vende P, Piron M, Castagne N, Poncet D 2000. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J Virol* 74: 7064-7071.

Vende P, Taraporewala Z, Poncet D, Patton JT 2002. RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. *J Virol* 10: 5291-5299.

Vesikari T, Sarkkinen HK, Maki M 1981. Quantitative aspects of rotavirus excretion in childhood. *Acta Paediatr* 70: 717-721.

Vesikari T, Isolauri E, Delem A, D'Hondt E, André FE, Beards GM, Flewett TH 1985. Clinical efficacy of the RIT 4237 live attenuated bovine rotavirus vaccine in infants vaccinated before a rotavirus epidemic. *J Pediatr* 107: 189-194.

Vieira S 1999. Experimentos inteiramente ao acaso. In: Vieira, S (ed). *Estatística experimental*. 2. ed, Ed. Atlas, São Paulo, cap. 4, p. 43-50.

Ward RI, Bernstein DI, Young EC, Sherwood JR, Knowlton DR, Schiff GM 1986. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *J Infect Dis* 154: 871-880.

Welch SK, Crawford SE, Estes MK 1989. Rotavirus SA11 genome segment 11 protein is a nonstructural phosphoprotein. *J Virol* 63: 3974-3982.

Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier A 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 9: 247-262.

Wyatt RG, Yolken RH, Urrutia JJ, Mata I, Greenberg HB, Chanock RM, Kapikian AZ 1979. Diarrhea associated with rotavirus in rural Guatemala: a longitudinal study of 24 infants and young children. *Am J Trop Med Hyg* 28: 325-328.

Yolken R, Wilde J 1994. Assays for detecting human rotavirus. In: Kapikian AZ (ed.), *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*. Marcel Dekker, New York, p.251-278.

Zarate S, Espinosa R, Romero D, Mendez E, Arias CF, Lopez S 2000. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J Virol* 74: 593-599.

Zeng CQ, Estes MK, Charpilienne A, Cohen J 1998. The N terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3. *J Virol* 72: 201-208.

9.2. ANEXO 2 – Modelo de Termo de Consentimento utilizado no estudo**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS****TERMO DE CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA**

Eu, _____, RG: _____, CPF: _____ nº de prontuário: _____ nº de matrícula: _____ abaixo assinado, concordo em participar do estudo: *Estudo prospectivo de Rotavirus A em neonatos na cidade de Goiânia-Goiás*, como responsável pelo sujeito. Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora Prof^a *Joana Ambrosina do Carmo* sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/ tratamento.

Goiânia, _____

Nome e Assinatura do (a) responsável: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas: (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____ **Assinatura:** _____

Nome: _____ **Assinatura:** _____

Observações complementares:

10. APÊNDICE

10.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Solução utilizada para o preparo das suspensões fecais

1. Tampão salina fosfato (PBS) – pH 7,4

NaCl.....	8 g
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O.....	2,89 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Cloreto de potássio (KCl).....	0,2 g
Água destilada estéril q.s.p.....	1000 mL

Soluções utilizadas para a extração do *dsRNA* para a realização da EGPA

1. Duodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%

SDS.....	10 g
Água destilada estéril q.s.p.....	100 mL

2. Fenol saturado

Fenol P.A.....	5 mL
Água destilada estéril q.s.p.....	5 mL

3. Fenol/Clorofórmio (v/v)

Fenol saturado.....	5 mL
Clorofórmio P.A.....	5 mL

4. Cloreto de sódio (NaCl) a 20%

NaCl.....20 g

Água destilada estéril q.s.p.....100 mL

5. Solução A (Acrilamida/Bisacrilamida)

Acrilamida.....50 g

N, N'- Metileno-Bis-Acrilamida.....1,3 g

Água destilada estéril q.s.p.....100 mL

6. Solução B (Tris/HCl) – pH 8,8

Tris base.....18,17 g

Água destilada estéril q.s.p.....100 mL

7. Solução C (Tris/HCl) – pH 6,8

Tris base.....6,06 g

Água destilada estéril q.s.p.....100 mL

8. Solução D (Persulfato de amônio a 10%)

Persulfato de amônio.....10 g

Água destilada estéril q.s.p.....10 mL

9. N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino (TEMED) a 50%

TEMED.....5 mL

Água destilada estéril.....5 mL

10. Azul de bromofenol a 1%

Azul de bromofenol.....	1 g
Água destilada estéril q.s.p.....	100 mL

11. Mistura dissociante

Uréia P.A.....	3 g
SDS a 10%.....	3 mL
2-Mercaptoetanol.....	0,5 mL
Solução C.....	1,25 mL
Azul de bromofenol a 1%.....	0,1 mL
Água destilada estéril q.s.p.....	10 mL

12. Tampão Tris/Glicina 4X

Tris base.....	12 g
Glicina	57,6 g
Água destilada estéril q.s.p.....	500 mL

Solução de uso (Tampão Tris/Glicina 1X)

13. Gel de poliacrilamida a 7,5% (separador)

Solução A.....	3,4 mL
Solução B.....	5,8 mL
Água destilada estéril.....	12,9 mL
Persulfato de amônio a 10%.....	1 mL
TEMED a 50%.....	0,02 mL

14. Gel de poliacrilamida a 3,5% (concentrador)

Solução A.....	0,3 mL
Solução C.....	1 mL
Água destilada estéril.....	2,5 mL
Persulfato de amônio a 10%.....	0,2 mL
TEMED a 50%.....	0,02 mL

15. Solução fixadora

Etanol P.A.....	50 mL
Ácido acético P.A.....	5 mL
Água destilada estéril q.s.p.....	500 mL

16. Solução corante

Nitro de prata P.A.....	0,37 g
Água destilada estéril q.s.p.....	200 mL

17. Solução reveladora

Hidróxido de sódio (NaOH).....	15 g
Formaldeído a 40%.....	3,8 mL
Água destilada estéril q.s.p.....	500 mL

18. Solução para interromper a revelação dos géis

Ácido acético P.A.....	10 mL
Água destilada estéril q.s.p.....	200 mL

Soluções utilizadas para a extração do *dsRNA* do *Rotavirus A*

1. Tampão Tris/HCl 1M – pH 6,4

Tris base.....121,1 g

Água destilada estéril q.s.p.....1000 mL

2. Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,2 M – pH 8,0

EDTA.....74,4 g

Água bidestilada estéril q.s.p.....1000 mL

3. Sílica

Dióxido de sílica.....60 g

Água bidestilada estéril q.s.p.....500 mL

4. Tampão L6

Isotiocianato da guanidina (GUSCN).....120 g

Triton X-100.....2,6 mL

EDTA 0,2 M – pH 8,0.....22 mL

Tris/HCl 0,1 M – pH 6,4.....100 mL

5. Tampão L2

GUSCN.....120 g

Tris/HCl 0,1 M – pH 6,4.....100 mL

Soluções utilizadas para a corrida em gel de agarose

1. EDTA 0,5 M – pH 8,0

EDTA.....	186,1 g
NaOH.....	20 g
Água destilada estéril q.s.p.....	1000 mL

2. Tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 10X – pH 8,4

Tris base.....	108 g
Ácido bórico.....	55 g
EDTA 0,5 M – pH 8,0.....	40 mL
Água bidestilada estéril q.s.p.....	1000 mL

3. Solução de brometo de etídio 0,5 mg/mL

Brometo de etídio 10 mg/mL.....	50 µL
Água bidestilada estéril.....	950 µL

4. Tampão corante para amostras

Azul de bromofenol.....	25 mg
Xileno cianol.....	25 mL
Glicerol.....	3 mL
Água bidestilada estéril q.s.p.....	7 mL

5. Padrão de tamanho molecular (100 bp DNA ladder)

100 bp DNA ladder.....2 μ L

Tampão TBE 1X.....7 μ L

Tampão corante para amostras.....1

μ L