

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS

**Caracterização antigênica e molecular de amostras de  
rotavírus do tipo G1, obtidas de crianças participantes de  
estudos em gastroenterites virais, no período de 1982 a 2003,  
em Belém, Pará, Brasil**

*Luana da Silva Soares*

Belém - Pará

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS

**Caracterização antigênica e molecular de amostras de rotavírus do tipo G1, obtidas de crianças participantes de estudos em gastroenterites virais, no período de 1982 a 2003, em Belém, Pará, Brasil**

***Luana da Silva Soares***

Dissertação de mestrado apresentada ao Núcleo de Medicina Tropical para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre da C. Linhares

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. MSc. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas

Belém - Pará

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS

**Caracterização antigênica e molecular de amostras de rotavírus do tipo G1, obtidas de crianças participantes de estudos em gastroenterites virais no, período de 1982 a 2003, em Belém, Pará, Brasil**

Dissertação avaliada pela comissão composta pelos doutores:

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite  
Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz

Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado  
Universidade Federal do Pará, UFPA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita Catarina Medeiros Sousa  
Universidade Federal do Pará, UFPA

Suplente:

Prof. Dr. Wyller Alencar de Mello  
Instituto Evandro Chagas, MS, SVS

**Dissertação defendida e aprovada em 03 de julho de 2006**

S676c Soares, Luana da Silva

Caracterização antigênica e molecular de amostras de rotavírus do tipo G1, obtidas de crianças participantes de estudos em gastroenterites virais, no período de 1982 a 2003, em Belém, Pará, Brasil / Luana da Silva Soares. — Belém, 2006.

97f.: il.; 30cm.

Orientador: Alexandre da Costa Linhares

Dissertação (Mestrado em Patologia das Doenças Tropicais) — Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, 2006.

1. Infecções por rotavírus. 2. Gastroenterite. 3. Genótipo. 4. Variação genética. I. Linhares, Alexandre da Costa. II. Título.

CDU: 616.34-002

Trabalho realizado no Laboratório de Rotavírus da Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas (IEC), da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS), sob a orientação do Dr. Alexandre da Costa Linhares.

## DEDICATÓRIA

A Deus, por todas as realizações, vitórias e glórias que Ele me deu o privilégio de alcançar.

Aos meus pais, Messias e Klieds, pela graça de existir e incentivo a mim dedicado nesta longa caminhada.

Aos meus amores, Augusto e Ariela, pelo amor, compreensão e por estarem sempre ao meu lado e em meu coração.

Aos meus irmãos, Daiany e Thiago, pelo carinho e companheirismo durante a minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Alexandre da Costa Linhares, meu orientador, Chefe da Seção de Virologia do IEC, minha infinita gratidão pela confiança, paciência e conhecimentos repassados para realização e execução deste estudo.

À Dr<sup>a</sup> Joana Mascarenhas, minha co-orientadora, meus agradecimentos pelo imenso incentivo, apoio, amizade e com quem sempre pude e poderei contar no decorrer da minha vida profissional.

À Dr<sup>a</sup> Elisabeth Santos, Diretora do Instituto Evandro Chagas, pelo amparo técnico e institucional que esta “casa” me proporcionou para execução desta investigação.

À Dr<sup>a</sup> Edna Ishikawa, Coordenadora do Curso de Mestrado em Doenças Tropicais, bem como à secretária Socorro e demais funcionários, pela oportunidade em desenvolver este trabalho.

A todas as crianças e seus familiares que participaram com retidão e bondade deste estudo.

A todos os pesquisadores da Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas, Drs. Yvone Gabbay, Olinda Macêdo, Wyller Mello, Ronaldo Freitas, Lourdes Gomes, Talita Monteiro, Ceyla Castro, Darleise Oliveira e Ana Wanzeller, pelo estímulo dedicado.

Às minhas amigas Telma Vitorina e Mirleide Santos que sempre estiveram ao meu lado me apoiando nesta caminhada.

A auxiliar técnica Euzeni Menezes e às estagiárias Clarissa Lima e Sylvia Guerra, por toda ajuda e carinho concedido.

A todos da Seção de Virologia, em especial a auxiliar técnica Antônia Alves e o ex-estagiário Jackson Lima, que sempre me deram amparo e ajuda no desenvolvimento deste estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio que me foi dispensado.

Aos meus parentes e amigos, pela força, incentivo e por acreditarem nesta minha conquista.

A todos aqueles que participaram de alguma forma no desenvolvimento desta pesquisa.

## RESUMO

A mortalidade infantil permanece como um importante problema de saúde pública em escala mundial, principalmente nos países em desenvolvimento. Dos mais de 50 agentes etiológicos implicados nessa moléstia, os rotavírus se destacam por estarem associados a 111 milhões de episódios diarreicos, resultando em mais de 600.000 óbitos entre crianças menores de cinco anos, dos quais 82% são notificados nos países mais pobres do mundo. O estudo em questão objetivou a caracterização antigênica e molecular de amostras de rotavírus do tipo G1, obtidas de crianças participantes de estudos em gastroenterites virais, no período de 1982 a 2003, em Belém, Pará, Brasil. Cento e quarenta e oito espécimes de rotavírus G1 foram analisados na presente investigação. A prevalência global do tipo G1 foi de 41,3%, sendo que a frequência deste genotipo no decorrer dos estudos analisados variou de 11,0% a 67,6%. A caracterização dos eletroferotipos, sorotipos G e genotipos P de rotavírus G1 ocorreram em frequências de 78,4%, 89,9% e 87,8%, respectivamente. Foram identificadas três variedades de eletroferotipos longo, sendo que a variedade L1 foi encontrada com maior frequência (79,3%). Os sorotipos G1, G9 e G1+G4 foram detectados em 88,0%, 9,8% e 2,2% dos espécimes, respectivamente. Detectou-se a infecção mista G1+G4 em uma amostra. A combinação binária prevalente foi P[8],G1, sendo responsável por 72,3% dos casos. Infecções mistas circularam em percentual de 20,0% , sendo detectados os genotipos P[4]+P[8],G1, P[6]+P[8],G1, P[4]+P[6],G1, P[4]+P[6]+P[8],G1 e P[6]+P[8],G1+G4. O tipo G1 circulou do 2º ao 35º meses de idade e registrou-se maior número de casos na faixa compreendida entre 6 a 16 meses de idade. Não se verificou diferença de gravidade entre as variedades genotípicas G1 e outros tipos de rotavírus. A presente análise assume um caráter pioneiro no Brasil, permitindo ampliar os conhecimentos acerca da diversidade antigênica e molecular das infecções pelo tipo G1 de rotavírus e esses resultados permitirão entender a complexidade genética de tais agentes virais.

**Palavras chave:** diarreia, rotavírus, diversidade genética e molecular.

## ABSTRACT

Infant mortality remains an important problem of public health worldwide, mainly in developing countries. Of more than the 50 etiologic agents implied in this disease, rotavirus causes 111 million episodes of diarrhoea, resulting in more than 600,000 deaths among children less than five years, of which 82% are notified in the poorest countries of the world. This study aimed at the antigenic and molecular characterization of G1 rotavirus strains among children participating of viral gastroenteritis studies, carried out from 1982 to 2003, in Belém, Pará, Brazil. One hundred and forty-eight specimens of G1 rotavirus were analyzed in the present investigation. Overall, the prevalence of the G1 type was of 41.3%, being that frequencies of this genotype through studies ranged from 11.0% to 67.6%. Electropherotypes, G serotypes and P genotypes characterization of G1 rotavirus occurred in frequencies of 78.4%, 89.9% and 87.8%, respectively. Three long electropherotypes varieties were identified, being that the L1 variety was found frequently (79.3%). The G1, G9 and G1+G4 serotypes were detected in 88.0%, 9.8% and 2.2% of the specimens, respectively. Mixed infection by G1+G4 genotype was detected in one sample. The prevalent binary combination was P[8],G1, being responsible for 72.3% of the cases. Mixed infections circulated in percentage of 20.0%, including genotypes P[4]+P[8],G1, P[6]+P[8],G1, P[4]+P[6],G1, P[4]+P[6]+P[8],G1 and P[6]+P[8],G1+G4. The G1 genotype circulated among 2<sup>nd</sup> to 35<sup>th</sup> months of age and a highest number of cases was registered between 6 to 16 months of age. Clinical severity differences among G1 and other genotypes of rotavirus were not verified. The present analysis gathers pioneer findings in Brazil, allowing to extend the knowledge concerning the antigenic and molecular diversity of the infections by G1 rotavirus and these results will allow to understand the genetic complexity of such viral agents.

**Key words:** diarrhoea, rotavirus, genetic and molecular diversity.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	12
1.1. GENERALIDADES	12
1.2. HISTÓRICO	14
1.3. O ROTAVÍRUS	15
<b>1.3.1. Taxonomia</b>	15
<b>1.3.2. Morfologia viral</b>	15
<b>1.3.3. Organização genômica</b>	17
1.4. TRANSMISSÃO DOS ROTAVÍRUS	19
1.5. CICLO DE REPLICAÇÃO DOS ROTAVÍRUS	20
1.6. PATOGENIA DA INFECÇÃO PELOS ROTAVÍRUS	21
1.7. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS INFECÇÕES PELOS ROTAVÍRUS	22
1.8. IMUNIDADE NAS INFECÇÕES PELOS ROTAVÍRUS	23
1.9. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS INFECÇÕES POR ROTAVÍRUS	25
1.10. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	29
1.11. TRATAMENTO	30
1.12. VACINAS CONTRA ROTAVÍRUS	31
<b>2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO</b>	33
<b>3. ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA</b>	34
<b>4. OBJETIVOS</b>	35
4.1. OBJETIVO GERAL	35
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>	37

5.1. MATERIAL	37
5.1.1. Área de estudo	37
5.1.2. Pacientes e espécimes clínicos	37
5.1.3. “Iniciadores” usados para detecção e caracterização genotípica de rotavírus	41
5.1.4. Soluções	42
5.2. MÉTODOS	42
5.2.1. Ensaio Imunoenzimático (EIE) para detecção de rotavírus	42
5.2.2. Suspensão fecal	43
5.2.3. Ensaio Imunoenzimático com anticorpos monoclonais específicos para o sorotipo G	44
5.2.4. Extração do genoma viral	44
5.2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)	45
5.2.6. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	46
5.2.7. Análise estatística	49
6. RESULTADOS	50
6.1. DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DO TIPO G1 DE ROTAVÍRUS	50
6.2. DETERMINAÇÃO DOS ELETROFEROTIPOS PELA EGPA	51
6.3. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA SOROTIPO G DE ROTAVÍRUS	52
6.4. GENOTIPAGEM PARA OS TIPOS G E P DE ROTAVÍRUS	54
6.5. RESULTADOS EPIDEMIOLÓGICOS	58
6.6. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	63
7. DISCUSSÃO	65
8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	72
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. GENERALIDADES

A mortalidade infantil permanece como um importante problema de saúde pública em escala mundial, principalmente nos países em desenvolvimento. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), das 10,6 milhões de mortes entre crianças menores de cinco anos, a doença diarréica é responsável por aproximadamente 18% dos casos que ocorrem anualmente (Bryce *et al.*, 2005). Em países da América Latina, África e Ásia estima-se que ocorram, a cada ano, cerca de 744 milhões a 1 bilhão de casos de diarréia, nesta mesma faixa etária, ocasionando 6600 a 9000 mortes por dia (Linhares e Bresee, 2003). No Brasil, por meio do programa de Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas (MMDA) do Ministério da Saúde, foram registrados quase 1 milhão e 200 mil casos de diarréia entre menores de 5 anos, em 2004 (Brasil, 2006).

A diarréia aguda é caracterizada pelo aumento do número de evacuações, ocorrendo fezes aquosas ou semi-sólidas, acompanhadas de febre, vômitos e cólicas, podendo perdurar por até 14 dias. O impacto que esta doença ocasiona está relacionado aos danos à saúde da população infantil, bem como no contexto da sociedade em geral (Brasil, 2006).

Dos mais de 50 agentes etiológicos implicados nessa moléstia, os rotavírus se destacam como os mais importantes epidemiologicamente, por infectarem os seres humanos, além de várias espécies de aves e mamíferos (Hart *et al.*, 2002). Com efeito, cerca de 111 milhões de episódios diarréicos estão associados a esses vírus, a cada ano, resultando em mais de 600.000 óbitos entre crianças menores de cinco anos, dos quais 82% são notificados nos países mais pobres (Parashar *et al.*, 2003; 2006).

A ocorrência universal dos rotavírus é amplamente reconhecida, sabendo-se que praticamente todas as crianças até os cinco anos de idade já se infectaram (Parashar *et al.*, 2003). Esses vírus são referidos como “agentes democráticos”, visto que infectam crianças de todas as partes do mundo, compreendendo diferentes raças e classes sociais (Kapikian *et al.*, 2001).

As conseqüências da infecção causada por esses agentes virais são bastante diversas, dependendo do perfil sócio-econômico de cada país. Por exemplo, nos Estados Unidos, anualmente, os rotavírus causam menos de 40 mortes (Glass *et al.*, 1996), enquanto na África, 110.000 a 150.000 crianças menores de cinco anos morrem em conseqüência da infecção por esses agentes (Molbak *et al.*, 2000).

## 1.2. HISTÓRICO

Os rotavírus foram descobertos há aproximadamente três décadas em estudo realizado por Bishop *et al.* (1973) em Melbourne, Austrália, por meio da microscopia eletrônica (ME). Esses investigadores observaram pela primeira vez esses vírus no epitélio duodenal de crianças com diarreia de etiologia não-bacteriana, recebendo a denominação de Duovírus. Devido ao seu aspecto semelhante ao de uma roda, foram denominados posteriormente Rotavírus (Figura 1) (Flewett *et al.*, 1973). A primeira detecção de rotavírus no Brasil foi registrada por Linhares *et al.* (1977), a partir de um estudo-piloto realizado em Belém, Pará, que reuniu 25 crianças com quadro de gastroenterite aguda sob atendimentos ambulatorial e hospitalar. A partir de então, inúmeras investigações foram conduzidas em âmbito nacional, ressaltando os aspectos epidemiológicos de tais agentes virais (Oliveira e Linhares, 1999; Linhares, 2000; Cardoso *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2003; Luz *et al.*, 2005; Carneiro *et al.*, 2005).

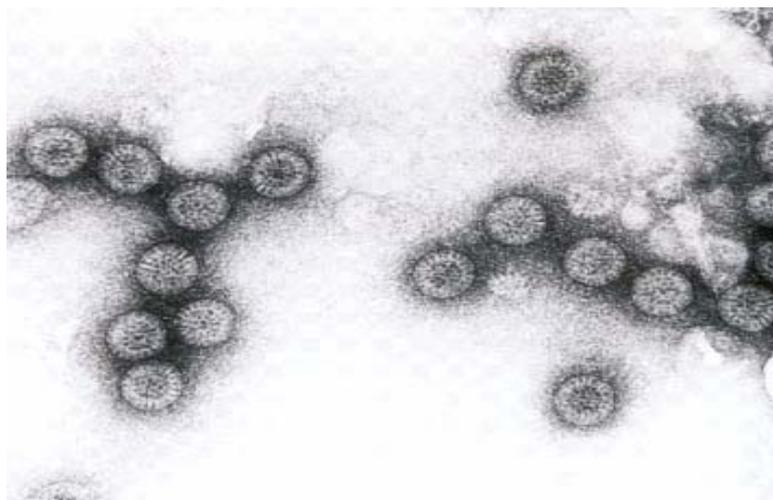


Figura 1. Micrografia eletrônica do rotavírus.

Cortesia de Dr<sup>a</sup>. Yvone Gabbay, IEC, 2004.

### 1.3. O ROTAVÍRUS

#### 1.3.1. Taxonomia

São vírus que contêm ácido ribonucléico de dupla cadeia, pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*. Apresentam três especificidades antigênicas, quais sejam, grupo, subgrupo e genotipo. Existem sete grupos (A-G) (Kapikian *et al.*, 2001), quatro subgrupos (I, II, I+II e não-I/não-II) (Desselberger, 1996) e pelo menos quinze sorotipos/genotipos G e vinte e seis genotipos P (Rao *et al.*, 2000; Martella *et al.*, 2006). Os genotipos são determinados via métodos moleculares, enquanto os sorotipos por de neutralização.

#### 1.3.2. Morfologia viral

A partícula completa do rotavírus mede cerca de 100 nm de diâmetro, não possui envelope e é dotada de nucleocapsídeo exibindo simetria icosaédrica. É constituída por três camadas protéicas concêntricas reunindo os capsídeos externo e interno, além do core intimamente associado ao genoma viral; este, composto de ácido ribonucléico com dupla cadeia contendo 11 segmentos distintos, denominado dsRNA (*double-stranded RNA*) (Figura 2).

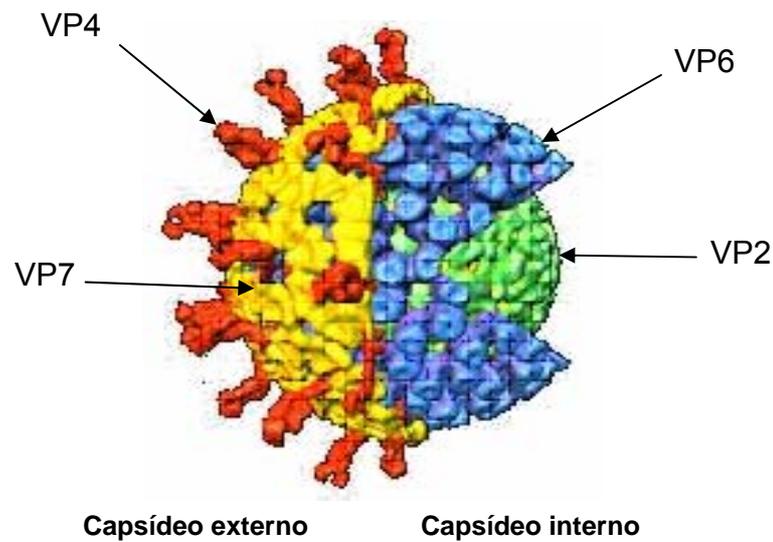


Figura 2. Representação tridimensional do rotavírus demonstrando as proteínas do capsídeo externo, interno e core.

Adaptado de Estes, 2001.

O capsídeo externo é composto de 780 e 120 moléculas das proteínas VP7 e VP4, respectivamente. A VP7, uma glicoproteína, apresenta massa molecular de 38 kDa (kilo Dalton) e constitui 30% da partícula viral. A VP4 compõe as 60 projeções com cerca de 10 a 12 nm de comprimento, massa molecular de 88 kDa e compreende 1,5% do vírion. É clivada por ação de enzimas proteolíticas, dando origem a dois fragmentos, VP5\* (60 kDa) e VP8\* (28 kDa), processo envolvido no potencial infectante viral (Estes, 2001; Kapikian *et al.*, 2001).

O capsídeo interno é formado por 780 moléculas da proteína VP6, sendo esta a mais abundante, e constitui 51% do vírion. Possui massa molecular de 41 kDa

e interage tanto com as proteínas mais externas quanto as do core. Este polipeptídeo parece estar envolvido no processo de entrada na célula hospedeira e também se associando à transcrição do RNA viral (Estes, 2001).

O core é constituído pelas proteínas VP1, VP2 e VP3, sendo que a VP2 é a mais abundante e se encontra disposta em 120 moléculas. A VP2 interage com a proteína não estrutural NSP5, estando ambas relacionadas no processo de revestimento do genoma viral (Estes, 2001; Berois *et al.*, 2003). A VP1 é uma RNA polimerase dependente de RNA e está envolvida nos processos de transcrição e replicação virais. A VP3 ainda possui sua função pouco conhecida, porém se sabe que ela é uma metil e guanililtransferase e, assim como a VP1 e VP2, concorre para o mecanismo de revestimento do core (Chen *et al.*, 1999; Estes, 2001; Jayaram *et al.*, 2004).

### **1.3.3. Organização genômica**

O genoma viral possui 18550 pares de base (pb), mostrando-se rico em adenina e uracila, e contém onze segmentos de dsRNA, com massas moleculares que variam de 0,6 a 3,3 kilopares de bases (Kb). Os segmentos genômicos têm uma estrutura semelhante, sendo que no sentido 5' → 3' a seqüência dos genes inicia com uma guanina, seguida por região não codificante. Logo após é encontrada uma “fase aberta de leitura” (*ORF- open reading frame*) para codificação da proteína, acompanhada de um códon de “terminação” e novamente uma área não codificadora finalizada por citosina (Figura 3).

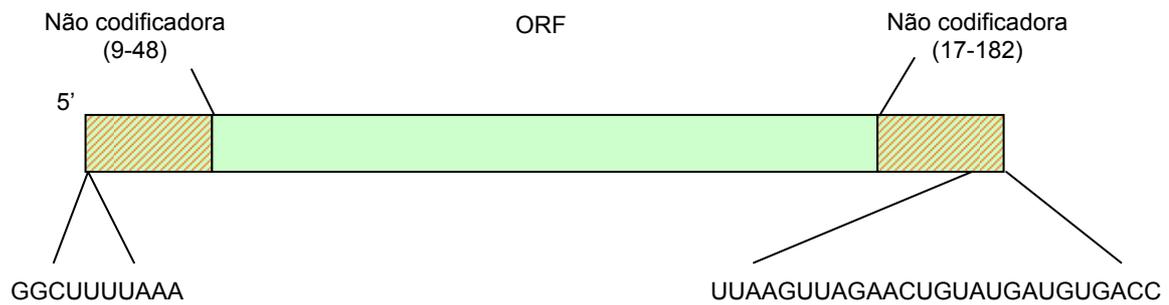


Figura 3. Representação esquemática dos segmentos genômicos de rotavírus.

Adaptado de Estes, 2001.

Cada segmento codifica uma proteína, com exceção do 11º que se associa à síntese de dois polipeptídios, totalizando doze, sendo seis não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6) e outras seis estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7). A VP4 define os genótipos **P**, assim designados pela proteína revelar-se sensível à **protease**. A **glicoproteína** VP7, por sua vez, determina os sorótipos/genótipos **G**, sendo codificada pelos genes 7, 8 ou 9, dependendo da amostra viral (Kapikian *et al.*, 2001).

Dada a natureza segmentada do genoma viral, este é analisado pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). De acordo com a mobilidade de cada segmento, devido à diferença de massa molecular, eles podem ser agrupados em quatro classes: classe I, englobando os genes 1 a 4; II, 5 e 6; III, 7, 8 e 9; e IV, 10 e 11. Também por meio da EGPA, se pode fazer a classificação do perfil eletroforético, baseada na migração do 11º segmento, em longo, curto e super-curto. Existe uma correlação consistente entre esses perfis com subgrupo e tipo G

de rotavírus, já que espécimes perfil longo pertencem ao subgrupo II e denotam tipo G1, G3, G4 ou G9. Os perfis curtos, por sua vez, são subgrupo I e tipo G2. Já os perfis supercurtos, pertencem ao subgrupo I e tipo G8 (Taniguchi e Urasawa, 1995; Kapikian *et al.*, 2001).

#### 1.4. TRANSMISSÃO DOS ROTAVÍRUS

A principal via de transmissão dos rotavírus é a fecal-oral, e durante os episódios diarréicos são eliminadas cerca de um trilhão de partículas virais por mililitro das fezes, sendo a dose infectante representada por apenas dez partículas virais (Ward *et al.*, 1986). A excreção viral máxima se dá entre o 3º e o 4º dias após o início dos sintomas (Kapikian *et al.*, 2001).

Postula-se a transmissão pela via respiratória, por meio de aerossóis, a julgar pela presença de anticorpos no trato respiratório de crianças (Zheng *et al.*, 1991). A contaminação através de fômites também já foi relatada (Sattar *et al.*, 1994).

A transmissão de rotavírus animal para seres humanos é mais provável de ocorrer nos países em desenvolvimento, onde em geral as pessoas vivem sob precárias condições de higiene e têm maior contato com animais, principalmente bovino, suíno e aves (Jain *et al.*, 2001). No Brasil, vários trabalhos têm mostrado o envolvimento das amostras de origem suína, especificamente as dos sorotipos G5 e G9, causando diarreia em crianças, sugerindo uma constante permuta de material genético entre as amostras virais de origens humana e animal (Gusmão *et al.*, 1994;

Alfieri *et al.*, 1996; Leite *et al.*, 1996; Timenetsky *et al.*, 1997; Mascarenhas *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2005).

### 1.5. CICLO DE REPLICAÇÃO DOS ROTAVÍRUS

O principal sítio de replicação viral é o intestino delgado, em particular o jejuno, situando-se especificamente nas células epiteliais maduras que revestem as microvilosidades intestinais. A entrada dos rotavírus nos enterócitos é um processo até então não elucidado plenamente. Estudos recentes demonstram que esta etapa é muito complexa e envolve várias moléculas (ácido siálico, integrinas, proteína hsc70) como possíveis receptores celulares (Lopez e Arias, 2004; 2006). Sabe-se que a clivagem da proteína VP4 desencadeia o processo infeccioso, promovendo a penetração do vírus e desse mecanismo também participa a VP7, que atua como moduladora da VP4 (Estes, 2001).

Após a internalização, o vírion é transportado ao lisossomo onde ocorre a perda do seu revestimento externo por ação das enzimas lisossomais devido às baixas concentrações de íons cálcio, dando origem a partículas de dupla camada. Em seguida há a ativação da transcriptase viral, promovendo a produção de RNAm tanto para formação das proteínas virais como constituindo em moldes com vistas à formação das progênies. Os canais que atravessam o core e o capsídeo interno permitem o efluxo de tais RNAm que são traduzidos. Partículas subvirais são desenvolvidas e agrupadas em áreas eletrodensas denominadas viroplasmas, localizadas próximas ao retículo endoplasmático (RE). Então, tais partículas

atravessam para o interior do RE por ação da glicoproteína não estrutural NSP4, que atua como um receptor intracelular. As partículas adquirem um envelope transitório devido à membrana do RE, que posteriormente é perdido e substituído por uma fina camada de proteína que constitui o capsídeo externo. Por fim, partículas virais maduras são liberadas por meio da lise celular (Ramig, 1997; Estes, 2001; Jayaram *et al.*, 2004; Ball *et al.*, 2005).

## 1.6. PATOGENIA DA INFECÇÃO PELOS ROTAVÍRUS

Os mecanismos fisiopatológicos da gastroenterite associada aos rotavírus ainda não estão totalmente esclarecidos. A extensa lesão do epitélio desencadeia o fenômeno de má-absorção, devido principalmente à depressão transitória no nível das dissacaridases, particularmente a lactase, o que resultaria no caráter essencialmente osmótico da diarreia (Bishop *et al.*, 1996). Experimentos em modelos murinos, entretanto, demonstram o papel da proteína não estrutural NSP4 no tocante ao seu potencial enterotoxigênico (Ball *et al.*, 1996). Essa proteína desencadearia o efluxo de íons  $\text{Cl}^-$  e água para o lúmen intestinal, provocando um quadro diarréico de natureza secretora (Estes *et al.*, 2001). Observações subseqüentes suscitam a hipótese de que a secreção dos fluidos e eletrólitos decorre da ativação direta do sistema nervoso entérico (Lundgren *et al.*, 2000) (Figura 4).

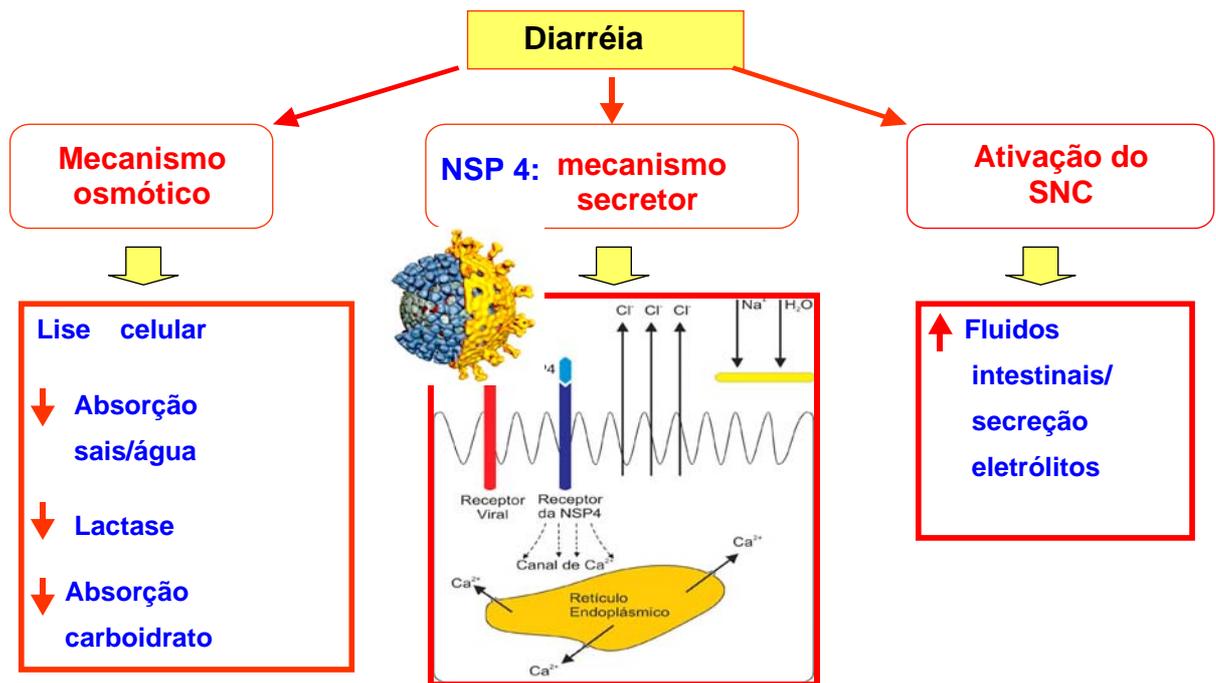


Figura 4. Representação esquemática dos potenciais mecanismos envolvidos na patogênese da diarreia provocada pelos rotavírus.

Adaptado de Linhares *et al.*, 2005.

## 1.7. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS INFECÇÕES PELOS ROTAVÍRUS

As infecções pelos rotavírus podem ser assintomáticas ou se expressarem como gastroenterite moderada ou grave. O período de incubação é curto (um a três dias), evoluindo para o aparecimento de vômitos, febre moderada/alta e diarreia aquosa que perduram por 5 a 8 dias, podendo levar à desidratação. Caso não haja a intervenção terapêutica precoce o processo pode culminar com o óbito (Kapikian *et al.*, 2001).

Em geral, a mais expressiva incidência das infecções sintomáticas por esses vírus ocorre principalmente na faixa etária de 6 a 24 meses, e estudos demonstram que eles causam 12-71% dos episódios de gastroenterites graves nessa idade (O’Ryan *et al.*, 2001). Em contrapartida, prevalecem as formas inaparentes entre recém-nascidos e lactentes até os 3 a 4 meses, provavelmente em decorrência da proteção conferida pelos anticorpos de origem materna (Linhares *et al.*, 1989; Bishop *et al.*, 1996).

No tocante às manifestações clínicas atípicas, tais como encefalites, doença de Kawasaki, síndrome de Reye, ocasionadas pelos rotavírus já foram relatados em determinadas situações. Evidências apontam a associação entre infecções por rotavírus e casos de enterocolite necrotizante e gastroenterite hemorrágica em neonatos além de diarreia prolongada em pacientes imunocomprometidos. Nesse contexto, cabe ressaltar os casos de intussuscepção registrados nos Estados Unidos devido à administração da vacina quadrivalente RRV-TV contra rotavírus (Kapikian *et al.*, 2001; Mascarenhas e Linhares, 2005).

## 1.8. IMUNIDADE NAS INFECÇÕES PELOS ROTAVÍRUS

Os mecanismos da resposta imunológica em relação à proteção contra diarreia por rotavírus ainda não estão bem esclarecidos (Kapikian *et al.*, 2001). Estudos demonstram que a proteção à infecção ou reinfeção envolve anticorpos sistêmicos e locais, bem como a imunidade celular (Offit *et al.*, 1992; Jiang *et al.*, 2002).

As proteínas VP4 e VP7 desempenham importante papel na indução da resistência à infecção por rotavírus, uma vez que estimulam a produção de anticorpos neutralizantes. Apesar disso, até o presente não se sabe qual dessas proteínas de superfície e que região são mais eficientes em induzir imunidade protetora (Kapikian *et al.*, 2001).

Postula-se que altos níveis de anticorpos sistêmicos, principalmente aqueles das classes IgA e IgG, estejam relacionados à proteção contra os episódios graves de diarreia por rotavírus (Kapikian *et al.*, 2001).

O papel dos anticorpos locais envolvidos na proteção ainda não está suficientemente elucidado, face à dificuldade na coleta dos fluidos intestinais de crianças com diarreia, o caráter fugaz dos anticorpos no intestino e a variação na sensibilidade dos testes utilizados. No entanto, há evidências da função protetora da IgA produzida por plasmócitos na lâmina própria intestinal (Kapikian *et al.* 2001; Jiang *et al.*, 2002).

A infecção por rotavírus induz imunidade tanto homotípica quanto heterotípica. No caso das primoinfecções há, principalmente, produção de anticorpos sorotipos-específicos, ao passo que a resposta imune nas reinfecções apresenta-se mais ampla, traduzindo-se também por anticorpos heterólogos (Jiang *et al.*, 2002).

A importância da imunidade celular na infecção por esses agentes encontra-se sobre investigação. Estudos demonstram que várias citocinas, tais como IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF- $\alpha$  estão envolvidas no processo de proteção contra a

infecção por rotavírus através de mecanismos como inibição da entrada desses vírus nas células do hospedeiro, aumento da atividade dos linfócitos T citotóxicos, todavia a função que tais citocinas desempenham na patogênese e no controle da doença permaneçam indefinidos (Bass, 1997; Rollo *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2002).

## 1.9. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS INFECÇÕES POR ROTAVÍRUS

Vigilâncias epidemiológicas realizadas em escala global demonstram a importância que esses agentes assumem na etiologia das diarreias infantis graves (Kapikian *et al.*, 2001; Doan *et al.*, 2003; Mota-Hernandez *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2003). Dentre as investigações conduzidas até então, observa-se que os rotavírus são responsáveis por 29 a 45% (média 39%) dos casos diarréicos que culminam em hospitalização, sendo que este índice aumentou em relação aos anos anteriores, uma vez que a média era de 22% (Parashar *et al.*, 2003; 2006). Em relação aos estudos dirigidos à comunidade, os resultados demonstram incidências que variam de 6% a 24%, com média alcançando 10% (Linhares *et al.*, 1989; Bern *et al.*, 1992).

Os rotavírus do grupo A são os mais importantes, uma vez que predominantemente infectam seres humanos (Kapikian *et al.*, 2001). Em relação aos dos grupos B e C, são isolados de animais como bovinos, caninos e suínos, sendo encontrados esporadicamente infectando seres humanos, uma vez que já foram relatados casos de diarreia associados a esses vírus (Sanekata *et al.*, 2003; Kuzuya *et al.*, 2005). Já os dos grupos D, E, F e G infectam apenas animais (Saif e Jiang, 1994).

Dentre os genótipos que infectam os seres humanos descrevem-se dez tipos G e onze P em diferentes combinações (Gentsch *et al.*, 1996; Hoshino e Kapikian, 2000). Em relação aos tipos de rotavírus circulantes freqüentemente detectados, assumem importância epidemiológica universal os tipos G1, G2, G3, G4 e, mais recentemente o G9, em combinação com P[8], P[4] ou P[6], sendo que as amostras P[8],G1 prevalecem amplamente. Não obstante, registra-se a emergência de outros sorótipos G como G5, G6, G8, G10 e G12, principalmente nos países em desenvolvimento (Leite *et al.*, 1996; Cunliffe *et al.*, 2001; Coluchi *et al.*, 2002; Bányai *et al.*, 2003; Castello *et al.*, 2006).

Em uma revisão bibliográfica realizada por Santos e Hoshino (2005), abrangendo 124 estudos publicados entre 1989 a 2004 nos cinco continentes, demonstrou-se que a combinação P[8],G1 esteve associada a 65% das amostras analisadas. O tipo G1 foi o predominante, sendo encontrado em 74% na Austrália/Oceania, 74% na América do Norte, 60% na Europa e na Ásia, 57% na América do Sul e 36% na África.

As infecções por rotavírus apresentam padrão de ocorrência sazonal nos países de clima tropical, onde ocorrem expressivamente no período do outono à primavera. Entretanto, tal configuração sazonal revela-se menos evidente nas regiões tropicais e subtropicais, onde se registra a infecção por tais vírus ao longo de todo o ano, apesar de se constituir um pico de incidência nos meses mais secos, compreendendo o período de maio a setembro (Cook *et al.*, 1990; Gusmão *et al.*, 1995; Linhares, 1997).

Grande parte dos estudos conduzidos no Brasil foi realizada no âmbito hospitalar ou ambulatorial, e demonstraram as taxas variáveis de prevalência das diarreias por rotavírus entre crianças menores de seis anos. Deste modo, a frequência das diarreias associadas a esses agentes variou de 12 a 42%, alcançando 36,5% na região norte (Linhares, 2000).

No que tange às infecções nosocomiais por rotavírus no Brasil, até o presente ainda se apresentam com uma abordagem pouco explorada, uma vez que a principal investigação ocorreu no período de 1992 a 1994 e envolveu 237 crianças atendidas em um hospital público de Belém. Os dados dessa investigação demonstraram que os rotavírus foram responsáveis por cerca de 30% dos episódios diarreicos desenvolvidos no decorrer da internação, bem como 7% das infecções assintomáticas entre crianças menores de cinco anos. Outro fato importante abordado foi em relação às amostras virais circulantes, onde se revelou que, em geral, as mesmas que são encontradas no meio comunitário estão circulando no ambiente hospitalar (Gusmão *et al.*, 1995; Gusmão *et al.*, 1999).

As investigações longitudinais conduzidas no seio comunitário, abordando principalmente os quadros leves e moderados de gastroenterite, foram desenvolvidas em número reduzido no Brasil ao longo das últimas três décadas. Um desses estudos foi realizado no início dos anos 80 e envolveu um grupo de 80 crianças que residiam em áreas periféricas de Belém, acompanhadas desde o nascimento até os três anos de idade. Foi observado que ocorreram, em média, 2,5 episódios diarreicos agudos por criança/ano, sendo que 10% estavam associados aos rotavírus (Linhares *et al.*, 1989).

Nos últimos anos, várias investigações acerca da epidemiologia molecular das infecções por rotavírus foram desenvolvidas no Brasil (Mascarenhas *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2003; Carmona *et al.*, 2004). Os resultados disponíveis revelam que os quatro tipos G de importância universal (G1, G2, G3 e G4) circulam predominantemente no Brasil, embora seja notável a diversidade antigênica no contexto nacional, considerando a detecção dos genótipos G5, G8 e G10 (Leite *et al.*, 1996; Volotão *et al.*, 2006). A par disso, registra-se a emergência do tipo G9 no país (Linhares *et al.*, 1996; Araújo *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2005).

Assim como outros vírus que apresentam o genoma segmentado, como influenza, os rotavírus possuem três principais mecanismos de variação genética. Nesse contexto, destaquem-se: a) acumulação de mutações pontuais; b) rearranjo genômico, em que dois vírus genotipicamente diferentes, após coinfeção, geram uma nova prole contendo seqüências derivadas dos vírus originais e c) recombinação intramolecular que são inserções, geralmente duplicações, ou deleções, na seqüência de segmentos (Taniguchi e Urasawa, 1995; Ramig, 1997; Iturriza-Gómara *et al.*, 2001). Com efeito, estudos a respeito da epidemiologia molecular dos rotavírus circulantes são necessários, a fim de verificar a eventual emergência de novas amostras virais, bem como para analisar a eficácia das vacinas frente a tal diversidade antigênica potencial.

## 1.10. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

As manifestações clínicas da doença causada pelos rotavírus não são suficientes para permitir o diagnóstico, já que outros enteropatógenos podem provocar quadros clínicos semelhantes, daí a necessidade da realização de exames laboratoriais específicos para sua confirmação.

A microscopia eletrônica de transmissão (ME) foi a primeira técnica utilizada, resultando na detecção pioneira de partículas virais em seções do epitélio intestinal. Essa técnica apresenta boa sensibilidade, sendo de rápida execução. Não obstante, envolve alto custo e requer técnicos qualificados, o que limita seu uso em larga escala.

O ensaio imunoenzimático (EIE) se constitui em uma técnica com altas sensibilidade e especificidade, amplamente usada e se baseia na utilização de anticorpos dirigidos ao antígeno comum (VP6) dos rotavírus do grupo A, embora já se encontrem reagentes em escala limitada para detecção de rotavírus dos grupos B e C (Kapikian *et al.*, 2001).

Outra técnica usada é a aglutinação em partículas de látex sensibilizadas com anticorpos específicos para a proteína VP6. Trata-se de um método com fácil e rápida execução, baixo custo e sensibilidade satisfatória.

A EGPA representa uma técnica sensível e específica que permite analisar o genoma viral revelando os padrões de migração dos segmentos

genômicos. Esse método permite, ainda, detectar os rotavírus atípicos, isto é, não integrantes do grupo A, aí se incluindo os que infectam animais (Kapikian *et al.*, 2001).

Com o advento da biologia molecular nas últimas décadas, novas técnicas foram introduzidas como recurso de caracterização genética, tais como: hibridização (*dot blot*), reação em cadeia pela polimerase (PCR), PCR-ELISA, PCR em tempo real, seqüenciamento de nucleotídeos e *microarray*. No entanto, sua aplicação ainda se restringe à área científica, emergindo como importantes “ferramentas” nos estudos epidemiológicos.

#### 1.11. TRATAMENTO

A reposição hidroeletrólítica, principalmente por via oral, apresenta-se como recurso terapêutico amplamente usado nos quadros de gastroenterites por rotavírus, tendo determinado um sensível declínio nos índices de morbi-mortalidade (AAP,CID, 1998). O tratamento por via parenteral é usado em situações de maior gravidade, justificando a necessidade da reposição de água e eletrólitos.

Várias investigações com finalidade em desenvolver novos tratamentos, tais como uso de probióticos, utilização de drogas antivirais, administração de imunoglobulinas por via oral, já foram conduzidos, todavia experimentos ulteriores devem ser levados a efeito para avaliar seus potenciais terapêuticos (Kapikian *et al.*, 2001).

## 1.12. VACINAS CONTRA ROTAVÍRUS

O desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra rotavírus é extremamente necessário, principalmente para uso nos países em desenvolvimento. Com isso, múltiplas estratégias objetivando o desenvolvimento de imunizantes que ofereçam proteção contra as diarreias por rotavírus, particularmente aquelas dotadas de maior gravidade, já foram desenvolvidas ou estão sendo analisadas em várias partes do mundo.

Neste contexto, a primeira geração de vacinas para rotavírus foi baseada na estratégia “Jenneriana”, que utilizava vírus de origem animal na expectativa de conferir proteção heterotípica contra esses vírus. A seguir, uma segunda geração foi proposta, designada de “Jenneriana modificada” envolvendo o co-cultivo de rotavírus de origem animal e humana, proporcionando o desenvolvimento de vacinas polivalentes usando estirpes rearranjadas. Uma terceira estratégia engloba as vacinas “não Jennerianas”, empregando vírus de origem humana atenuados ou isolados a partir de neonatos assintomáticos. Outras preparações isentas de partículas virais infecciosas, obtidas através da biologia molecular, estão em fase inicial de testes e representam alternativas futuras no processo de imunização (Bresee *et al.*, 2005; Mascarenhas e Linhares, 2005).

No momento, pelo menos duas diferentes preparações despontam como efetivas vacinas contra rotavírus, destacando-se uma preparação pentavalente de origens bovina e humana (Vesikari *et al.*, 2006), e outra de origem humana, atenuada RIX 4414, tipo P[8],G1, obtida de criança com diarreia em Cincinnati, Ohio,

EUA (Bernstein *et al.*, 1999). Esta vacina foi testada na Finlândia e em onze países da América Latina, onde demonstrou eficácia de até 100% contra os episódios mais graves de diarreia por esses agentes virais. Esse imunizante também mostrou induzir proteção homóloga (amostras G1) e heteróloga, inclusive contra o tipo G9, que se apresenta emergente no mundo todo (Salinas *et al.*, 2005; Linhares *et al.*, 2006; Ruiz-Palacios *et al.*, 2006).

Duas candidatas a vacinas contra rotavírus já foram testadas no Brasil. A primeira foi a tetravalente de origem símio-humana (RRV-TV), produzida pela Wyeth–Ayerst Research Inc. (Marietta, Pensilvânia, EUA), que demonstrou eficácia de até 75% nos casos mais graves de diarreia por rotavírus (Linhares *et al.*, 1999). Foi licenciada para uso nos Estados Unidos, porém suspensa devido a casos de intussuscepção ocorridos nas crianças vacinadas (CDC, 1999; Linhares e Bresee, 2000).

O segundo imunizante avaliado no país foi a amostra RIX 4414, atenuada de origem humana, obtida a partir de passagens em cultivo celular e clonagem da cepa original 89-12. Ela apresentou eficácia de 86,0% e 93,0% contra gastroenterites graves e hospitalizações por rotavírus, respectivamente (Linhares *et al.*, 2006). Atualmente este imunizante faz parte do calendário proposto pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI). Com esta ação, espera-se uma diminuição de até 42% das internações por gastroenterite em geral e 34% dos óbitos que ocorrem em crianças menores de cinco anos <[http://www.brasil.gov.br/noticias/ultimas\\_noticias/24263\\_saude\\_060306](http://www.brasil.gov.br/noticias/ultimas_noticias/24263_saude_060306)>.

## **2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO**

Vários estudos já demonstraram a ampla diversidade genética e antigênica dos rotavírus sugerido pela elevada frequência de infecções mistas e genotipos incomuns, refletido pelo complexo padrão de tais infecções virais. Esse estudo proporcionará um melhor entendimento a respeito da genética dos rotavírus G1 e o comportamento no decorrer das últimas duas décadas em Belém, Pará, uma vez que esse sorotipo/genotipo se apresenta amplamente difundido em todo globo. A par disso, servirá de apoio a estudos posteriores, principalmente os relacionados à implantação de vacinas anti-rotavírus e possíveis modificações epidemiológicas geradas pelo uso em larga escala desses imunizantes.

### **3. ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA**

O estudo não acarretou qualquer risco ou prejuízo para as crianças ou seus responsáveis. A presente investigação foi avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas, bem como pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) em respeito às normas nacionais e internacionais que regulamentam tal atividade.

Em relação aos aspectos de biossegurança, no decorrer dos procedimentos foram utilizados equipamentos de proteção individual (EPIs) e todo material potencialmente contaminado foi manipulado em laboratório de segurança NB3 com o uso de cabine de contenção biológica nível 2.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GERAL

Caracterização antigênica e molecular de amostras de rotavírus do tipo G1, obtidas de crianças participantes de estudos em gastroenterites virais no período de 1982 a 2003, em Belém, Pará, Brasil.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a prevalência das amostras de rotavírus G1 obtidas de vários estudos conduzidos em Belém, Pará;
- b) determinar a variabilidade de eletroferotipos dos rotavírus G1;
- c) comparar o genotipo G1 de rotavírus detectado por reação em cadeia pela polimerase, precedida por transcrição reversa (RT-PCR), com os sorotipos G estabelecidos por ensaio imunoenzimático (EIE), usando anticorpos monoclonais específicos;
- d) determinar os genotipos P dos rotavírus G1;
- e) determinar o percentual de infecções mistas e genotipos incomuns relacionados

ao tipo G1 circulante na população estudada;

f) determinar a frequência e distribuição temporal dos rotavírus G1 no decorrer dos estudos;

g) descrever a distribuição etária das crianças envolvidas nos estudos, em relação ao tipo G1; e

h) comparar a gravidade da gastroenterite causada por rotavírus do tipo G1 com outros tipos de rotavírus.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. MATERIAL**

#### **5.1.1. Área de estudo**

Os estudos a partir dos quais se obtiveram as amostras foram desenvolvidos em Belém, Pará, Brasil, localizada na Amazônia oriental, na confluência dos rios Pará e Guamá. O clima é tropical e úmido, apresentando níveis pluviométricos elevados no período de janeiro a abril. A cidade de Belém é a capital do Estado, possui uma área de 1065 Km<sup>2</sup>, sua população é estimada em 1.405.871 habitantes, incluindo 96.270 crianças menores de três anos de idade <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>>.

#### **5.1.2. Pacientes e espécimes clínicos**

Os espécimes clínicos analisados no presente estudo são oriundos de cinco projetos de pesquisa em gastroenterites virais levados a efeito em Belém, Pará, Brasil, a seguir descritos resumidamente (ver Anexo 1):

a) Estudo longitudinal das infecções por rotavírus entre crianças de Belém, Brasil (Estudo Longitudinal).

Essa investigação focalizou a epidemiologia e os aspectos clínicos da infecção por rotavírus. Foi realizada no período de dezembro de 1982 a março de 1986 e englobou um grupo de 80 crianças que residiam em áreas periféricas de Belém, Pará, acompanhadas desde o nascimento até os três anos de idade. A coleta dos espécimes fecais era feita após o nascimento e, durante o período de internação, esses materiais eram coletados diariamente. Após a saída da criança do hospital, as visitas para coleta das amostras eram efetuadas em domicílio, observando dias alternados, até o 14º dia. Após essa data as fezes eram coletadas quinzenalmente ou quando algum sinal de quadro diarréico ocorresse. As mães eram esclarecidas que diarréia significava três ou mais evacuações líquidas ou semilíquidas em um período de 24 horas. Foram detectados 441 episódios diarréicos, dos quais 36 se revelaram positivos para rotavírus pelo EIE, sendo que 9 foram analisados no estudo em questão.

b) Estudo da imunogenicidade e inocuidade da vacina tetravalente contra rotavírus de origem símio-humana, geneticamente rearranjada, em Belém, Pará, Brasil (Estudo com a vacina RRV-TV).

Esse estudo objetivou avaliar a inocuidade, imunogenicidade e eficácia de três doses da vacina tetravalente rearranjada “RRV-TV” em crianças saudáveis em Belém, Brasil. Foi conduzido no período de junho de 1990 a junho de 1992 e consistiu em um grupo de 540 crianças que receberam a “RRV-TV” ou placebo aos

1º, 3º e 5º meses de idade, sendo acompanhadas por dois anos após a tomada da primeira dose. Após a vacinação, cada criança era visitada duas vezes por semana para se detectarem casos de diarreia. Quando detectados, as amostras fecais eram coletadas diariamente até cessada a diarreia. Dos 1990 casos de diarreia avaliados pelo EIE, 90 se revelaram positivos para rotavírus, com o genotipo G1 detectado em 44 amostras.

c) Subgrupos, sorotipos e eletroferotipos de rotavírus em crianças hospitalizadas em Belém, Pará (Estudo Nosocomial).

Essa investigação teve como objetivo determinar o papel dos rotavírus na diarreia nosocomial. Foi realizada no período de novembro de 1992 a maio de 1994, quando se examinaram amostras fecais de 290 crianças (um espécime para cada) na faixa etária de 0 a 5 anos, internadas na Santa Casa de Misericórdia do Pará. Três grupos foram constituídos: nosocomial (crianças que desenvolveram diarreia pelo menos três dias depois da internação - 54 pacientes); comunitário (aquelas já admitidas com diarreia ou que a apresentavam nas primeiras 72 horas após a internação - 182 crianças); e não diarréico (que não apresentaram diarreia três dias antes e depois da coleta dos espécimes - 54 pacientes). Visitas diárias eram efetivadas à enfermaria. Dos 290 episódios diarréicos registrados, 48 apresentaram-se positivos para rotavírus pelo EIE, sendo que 14 espécimes denotaram a especificidade molecular G1.

d) Estudo de vigilância da doença diarréica por rotavírus em Belém, Pará, antes da implementação de vacinas (Estudo Hospital-Sentinela).

Esse estudo objetivou caracterizar a diversidade antigênica das amostras circulantes de rotavírus e o impacto da doença causada por esses agentes em Belém, Pará. Foi conduzido no período de maio de 1998 a maio de 2000, quando se coletaram 834 espécimes fecais de crianças na faixa etária de 0 a 3 anos, atendidas a nível ambulatorial ou internadas em um hospital público de Belém, Pará. As coletas no posto de saúde (ambulatórios) eram realizadas duas vezes por semana, enquanto que no hospital obtidas diariamente. Das 834 amostras coletadas, 281 foram positivas para rotavírus pelo EIE, sendo que 31 denotaram genotipo G1.

e) Estudo prospectivo, multicêntrico, de vigilância hospitalar para estimar o impacto da gastroenterite por rotavírus em crianças com menos de três anos de idade na América Latina (Vigilância Epidemiológica).

Essa vigilância visou a estimar o impacto da doença grave e a epidemiologia dos rotavírus em uma população de crianças menores de três anos. Conduziu-se tal estudo no período de março a outubro de 2003. Participaram dessa investigação 762 crianças que foram internadas em hospitais públicos de Belém, Pará, por apresentarem quadro diarréico agudo. Também se incluíram aquelas atendidas no setor de emergência das unidades de saúde, requerendo reidratação. As amostras eram coletadas no primeiro dia de internação. Dos 762 episódios diarréicos analisados, 343 (45,0%) foram positivos para rotavírus pelo EIE, e o genotipo G1 foi detectado em 232 amostras, sendo que 50 espécimes foram selecionados aleatoriamente a fim de constituir a presente análise.

### 5.1.3. “Iniciadores” usados para detecção e caracterização genotípica de rotavírus

Na Tabela 1 observam-se as seqüências dos “iniciadores” usados para detecção e caracterização genotípica dos tipos G (VP7) e P (VP4) de rotavírus. Todos os “iniciadores” utilizados foram sintetizados pela Invitrogen.

Tabela 1. Seqüências dos “iniciadores” utilizados na RT-PCR para caracterização molecular dos tipos G e P de rotavírus.

“Iniciadores”	Seqüência 5’-3’	Gene	Fragmento	Referências
			amplificado (pb)*	
9con1(+)	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG	VP7	-	Das <i>et al.</i> , 1994
9con2 (-)	GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA	VP7	904	Das <i>et al.</i> , 1994
Beg9 (+)	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	VP7	-	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
End9 (-)	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	VP7	1062	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
4con3 (+)	TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A	VP4	-	Gentsch <i>et al.</i> , 1992
4con2 (-)	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	VP4	876	Gentsch <i>et al.</i> , 1992
Sbeg9 (+)	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC	VP7	-	Gouvea <i>et al.</i> , 1994
9TI-1 (-) G1	TCT TGT CAA AGC AAA TAA TG	VP7	158	Das <i>et al.</i> , 1994
9TI-2 (-) G2	GTT AGA AAT GAT TCT CCA CT	VP7	244	Das <i>et al.</i> , 1994
9T-3P (-) G3	GTC CAG TTG CAG TGT TAG C	VP7	466	Das <i>et al.</i> , 1994
9T-4 (-) G4	GGG TCG ATG GAA AAT TCT	VP7	403	Das <i>et al.</i> , 1994
9T-9B (-) G9	TAT AAA GTC CAT TGC AC	VP7	110	Das <i>et al.</i> , 1994
FT5 (-) G5	CAT GTA CTC GTT GTT ACG TC	VP7	780	Gouvea <i>et al.</i> , 1994
DT6 (-) G6	CTA GTT CCT GTG TAG AAT C	VP7	500	Gouvea <i>et al.</i> , 1994
HT8 (-) G8	CGG TTC CGG ATT AGA CAC	VP7	274	Gouvea <i>et al.</i> , 1994
ET10 (-) G10	TTC AGC CGT TGC GAC TTC	VP7	715	Gouvea <i>et al.</i> , 1994
1T-1 (-) P[8]	TCT ACT TGG ATA ACG TGC	VP4	345	Gentsch <i>et al.</i> , 1992
2T-1 (-) P[4]	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	VP4	483	Gentsch <i>et al.</i> , 1992
3T-1 (-) P[6]	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	VP4	267	Gentsch <i>et al.</i> , 1992
4T-1 (-) P[9]	TGA GAC ATG CAA TTG GAC	VP4	391	Gentsch <i>et al.</i> , 1992

\*pb: pares de base

#### 5.1.4. Soluções

O preparo das soluções utilizadas no estudo em questão está descrito no Anexo 2.

### 5.2. MÉTODOS

Em todos os procedimentos realizados foram utilizados controles positivo e negativo com intuito de validar e evitar a possível contaminação dos testes.

#### 5.2.1. Ensaio Imunoenzimático (EIE) para detecção de rotavírus

As amostras fecais incluídas neste estudo, oriundas de pesquisas anteriores, foram submetidas ao EIE utilizando-se o *kit* DAKOPATTS (Copenhague, Dinamarca) para detecção de antígeno viral (VP6) de rotavírus do grupo A.

O teste foi realizado em microplacas de poliestireno com 96 orifícios, sensibilizadas com 100  $\mu$ L de anticorpo anti-rotavírus diluído a 1:50 (v/v) em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6. As placas foram então incubadas por 1 h à temperatura ambiente (TA= 25°C) e os reagentes aspirados com dispositivo semi-automático de lavagem (Nunc Immunowash) utilizando-se bomba a vácuo. A seguir, as placas foram lavadas cinco vezes com tampão PBS 10 mM, pH 7,5, contendo Tween 0,1% (v/v) Adicionaram-se 100  $\mu$ L do controle positivo e suspensões fecais

a 20% (v/v) em solução de NaCl 0,15 M. Os controles foram diluídos a 1:10 (v/v) em tampão de diluição e adicionados a quatro orifícios, sendo que dois sensibilizados com anticorpo anti-rotavírus e outros dois sem reagentes e incubados a TA por 1 h. Então, as placas foram lavadas novamente cinco vezes e adicionados 100  $\mu$ L da imunoglobulina normal de coelho conjugada à peroxidase diluída a 1:25 (v/v) no tampão de diluição. As placas foram incubadas por 30 min a TA e lavadas cinco vezes, sendo que a última lavagem se efetivou com tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0. Foram adicionados 100  $\mu$ L de substrato contendo 2 mg de 1,2-ortofenilenodiamino (OPD) diluído em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0. Adicionou-se 1  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio a 30%, antes do uso, para cada tablete de OPD. Incubaram-se as placas por 15 min a TA e, posteriormente, a reação foi estabilizada com 150  $\mu$ L de ácido sulfúrico 1 M, e sucedendo-se a leitura das densidades ópticas em fotômetro (Flow Multiskan) com filtro de 492 nm. Os valores de absorbância foram calculados pela adição da constante 0,07 à média dos controles negativos, sendo que as amostras foram consideradas positivas quando os valores da absorbância se revelaram iguais ou maiores que a média do padrão.

### 5.2.2. Suspensão fecal

Foram preparadas suspensões fecais a 10% em tampão Tris-Ca<sup>++</sup> 0.01 M, pH 7,2 a fim de proceder a extração do RNA viral. Em seguida, se homogeneizaram as suspensões sucedendo-se a centrifugação a 1700 x g por 10 min a 4 °C. Coletou-se o sobrenadante e estocando-o a -20 °C.

### **5.2.3. Ensaio Imunoenzimático com anticorpos monoclonais específicos para o sorotipo G**

Incubou-se por 16 h a 4 °C uma microplaca de poliestireno sensibilizada com 100 µL de fluidos ascíticos contendo os sorotipos específicos G1, G2, G3, G4 e G9, diluídos a 1:50 (G1 a G4) ou 1:16000 (G9) em PBS 10 mM, pH 7,5. A seguir procedeu-se duas lavagens com PBS-Tween contendo 1% de albumina bovina (BSA), e posteriormente ocorreu a incubação nas mesmas condições anteriores. Realizaram-se duas lavagens com PBS 10 mM, pH 7,5, adicionando-se 50 µL de suspensões fecais a 10%, diluídas a 1:3 em PBS-Tween contendo 10% de leite desnatado e incubados por 16 h a 4 °C. Em seguida a microplaca foi lavada novamente três vezes e, a seguir, adicionados 50 µL de imunoglobulina anti-IgG de coelho conjugada à peroxidase, diluída a 10% em PBS-Tween; a seguir houve a incubação por 1 h a 37°C e posterior lavagem por quatro vezes. Adicionaram-se 100 µL em cada orifício de substrato cromogênico e incubou-se a TA por 30 min. Adicionaram-se 25 µL de ácido sulfúrico a 20% (v/v). A leitura em fotômetro com filtro de 492 nm foi realizada, obtendo-se as densidades ópticas em dois orifícios da mesma amostra. As amostras que exibiram valores de absorbância superiores a 0,200 foram consideradas reagentes para determinado sorotipo.

### **5.2.4. Extração do genoma viral**

O genoma viral foi extraído a partir das suspensões fecais de acordo com o método descrito por Boom *et al.* (1990). A técnica consistiu na adição em tubos

estéreis de 200 µL de suspensão fecal, 20 µL de proteinase K e 200 µL de etanol, os quais foram homogeneizados e incubados a 56 °C por 10 min. A seguir foram adicionados 800 µL de tampão L6 e 20 µL de sílica, homogeneizados e incubados sob agitação lenta à TA por 30 min. A seguir os tubos foram agitados em “vortex” durante 10 seg e centrifugados a 20800 x g por 15 seg, decantando-se os sobrenadantes subseqüentemente. Aos sedimentos adicionaram-se 500 µL de tampão L2, agitando-se em “vortex” e sobrevivendo a centrifugação (20800 x g / 15 seg). Após essa etapa foram realizadas lavagens com etanol a 70 % (4 °C) e acetona (4 °C). Os sobrenadantes foram desprezados, incubando-se os sedimentos em banho-maria (BM), a temperatura de 56 °C por 15 min para evaporação da acetona. Em seguida, foram adicionados 60 µL de água milli-Q estéril, agitando-se por 15 seg, com incubação subseqüente em BM a 62 °C por 15 min. A seguir, os tubos foram centrifugados (20800 x g / 3 min) e os sobrenadantes, contendo o dsRNA puros, coletados e armazenados a -70 °C para realização de testes posteriores (EGPA e RT-PCR).

#### **5.2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)**

A análise dos perfis eletroforéticos de rotavírus foi realizada pela técnica de EGPA, de acordo com o procedimento descrito por Pereira *et al.* (1983). Dez microlitros de cada amostra de dsRNA extraída foram misturados a 2 µL de azul de bromofenol e aplicados a cada orifício do gel de poliacrilamida na concentração final de 5%. Esse gel foi submetido a eletroforese vertical, utilizando-se 100 V, 100 W e 21 mA por 2 h e 30 min. Após a corrida o gel foi retirado da cuba e os fragmentos do

genoma viral fixados com o uso de etanol e ácido acético, corados com nitrato de prata, seguido à revelação utilizando-se hidróxido de sódio 10 M e formaldeído a 37% (v/v). O perfil eletroforético foi visualizado em negatoscópio de luz branca, procedendo-se a classificação dos eletroferotipos de acordo com Herring *et al.* (1982).

#### 5.2.6. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Esta técnica foi executada de acordo com o preconizado por Das *et al.* (1994), Gouvea *et al.* (1990) e Gentsch *et al.* (1992), com modificações de Leite *et al.*, (1996). Observando-se em duas etapas:

##### a) Reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR)

Pelo fato do material genético do rotavírus ser de RNA, é necessária a produção de um DNA complementar (cDNA) para posterior amplificação. Na transcrição reversa, utilizou-se uma mistura de “iniciadores” consensuais 9con1/9con2 (20 $\mu$ M cada) para o tipo G de rotavírus humano, Beg9/End9 para G de rotavírus animais e 4con2/4con3 para P, à qual se adicionou uma quantidade de dsRNA que variou de 2 a 5  $\mu$ L, de acordo com a concentração de material genético observado na EGPA. Essa mistura foi desnaturada a 97 °C por 7 min, seguida de imersão em banho de gelo por 5 min para hibridização dos “iniciadores”. Foram adicionados 20  $\mu$ L da mistura da reação composta por dNTP, tampão 10X, MgCl<sub>2</sub> e

RT (*transcriptase reversa*) (Tabela 2), seguindo-se a incubação a 42 °C por 1 h, a fim de se transcreverem os dsRNA, sintetizando-se então os cDNA. Em seguida foram adicionados 25 µL da mistura contendo dNTPs, tampão 10X e a enzima Taq DNA polimerase (Tabela 2). Os tubos com os reagentes foram colocados em termociclador (DNA Thermal Cycler 480, Applied Biosystems) para realização de 35 ciclos de amplificação, cada um deles compreendendo temperaturas assim especificadas: 94 °C por 1 min (desnaturação), 42 °C por 1 min (hibridização), e 72 °C por 1 min (extensão), seguindo-se um ciclo final de extensão a 72 °C durante 10 min. Os cDNA foram conservados a 4 °C e submetidos a eletroforese horizontal utilizando-se gel de agarose a 1,5 % em tampão tris-borato-EDTA (TBE), sob 120 V, 400 mA por cerca de 45 min a 1 h. Ao final o gel foi corado com brometo de etídio (5 µg/mL) por 20 min a TA sob agitação, e os amplicons visualizados com o auxílio do sistema de fotodocumentação Bio Capt versão 12.1.

Tabela 2. Reagentes necessários na execução da RT-PCR para detecção de rotavírus.

REAGENTES	TRANSCRIÇÃO REVERSA 1X/ $\mu$ L	PCR 1X/ $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	11	18
dNTP 25mM*	4	4
Tampão 10X	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> 50mM	2	-
RT 10U*	0,5	-
Taq DNA Polimerase 2,5U <sup>†</sup>	-	0,5
Total	20	25

\*Mistura dos quatro deoxirribonucleotídeos trifosfato: dATP, dCTP, dGTP e dTTP.

\*SuperScript™ II RNase Reverse Transcriptase 10000U, 200 U/ $\mu$ L (Invitrogen)

<sup>†</sup>Taq DNA polimerase 250 U, 5 U/ $\mu$ L (Biotools)

#### b) Nested-PCR

Para caracterização genotípica dos rotavírus pela nested-PCR, foram usados 0,5  $\mu$ L do “iniciador” 9con1 e 0,5 $\mu$ L da mistura dos “iniciadores” específicos para os tipos G de rotavírus humanos (G1, G2, G3, G4 e G9). Em relação aos tipos G dos rotavírus oriundos de animais, foram utilizados 0,5  $\mu$ L do “iniciador” Sbeg9 e 0,5 $\mu$ L da mistura dos “iniciadores” específicos (G5, G6, G8 e G10). Para o tipo P foram usadas as mesmas concentrações dos “iniciadores” 4con3 e P[4], P[6], P[8] e P[9]. Adicionaram-se 2 ou 5  $\mu$ L, no caso de visualização ou não do produto de

amplificação, a 23 ou 25  $\mu\text{L}$  da mistura composta pelos reagentes da Tabela 3. Essa mistura foi submetida a 30 ciclos de amplificação com as mesmas condições de temperatura e tempo da RT-PCR. O produto do nested-PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % (m/v).

Tabela 3. Reagentes necessários para realização da nested-PCR.

REAGENTES	NESTED-PCR 1X/ $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	13 ou 15
dNTP 25mM	4
Tampão 10X	2,5
MgCl <sub>2</sub> 50Mm	2
Iniciadores específicos G ou P	1
Taq DNA Polimerase 2,5U	0,5
Total	23 ou 25

### 5.2.7. Análise estatística

As análises estatísticas aplicadas no presente estudo foram realizadas utilizando o programa BioEstat versão 3.0. Os testes paramétricos e não paramétricos foram feitos levando-se em consideração o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ), com correção de Yates e o teste Z. A significância estatística foi definida como  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DO TIPO G1 DE ROTAVÍRUS

A prevalência total do tipo G1 em crianças infectadas por rotavírus foi de 41,3% (330/798). Isto considerando a totalidade representada pelas 148 amostras que fizeram parte deste estudo, sendo 9 espécimes do Longitudinal, 44 da investigação com a vacina RRV-TV, 14 do Nosocomial, 31 do Hospital Sentinela e 50 da Vigilância Epidemiológica (Figura 5).

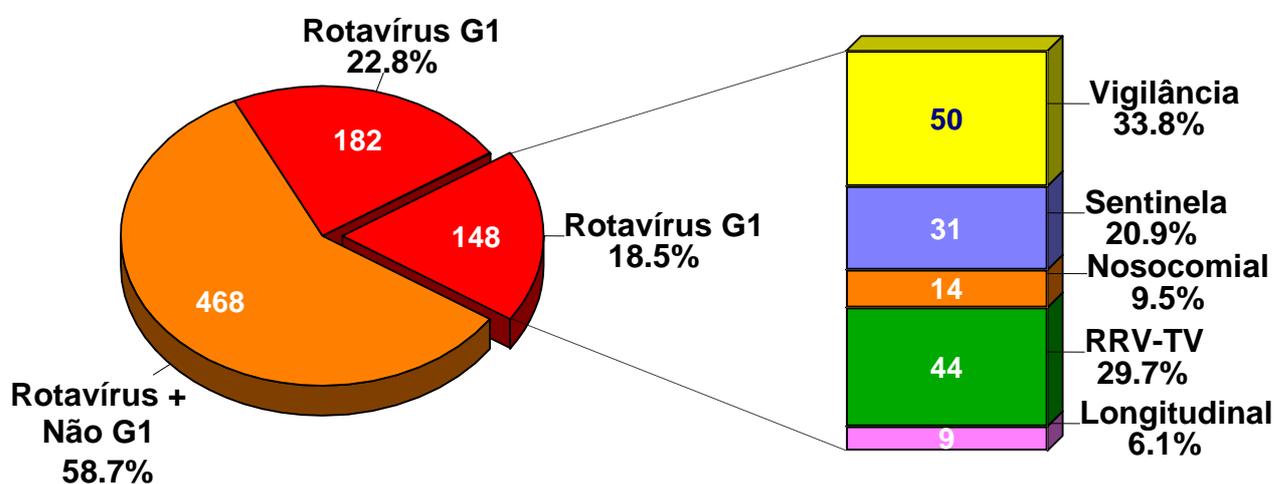
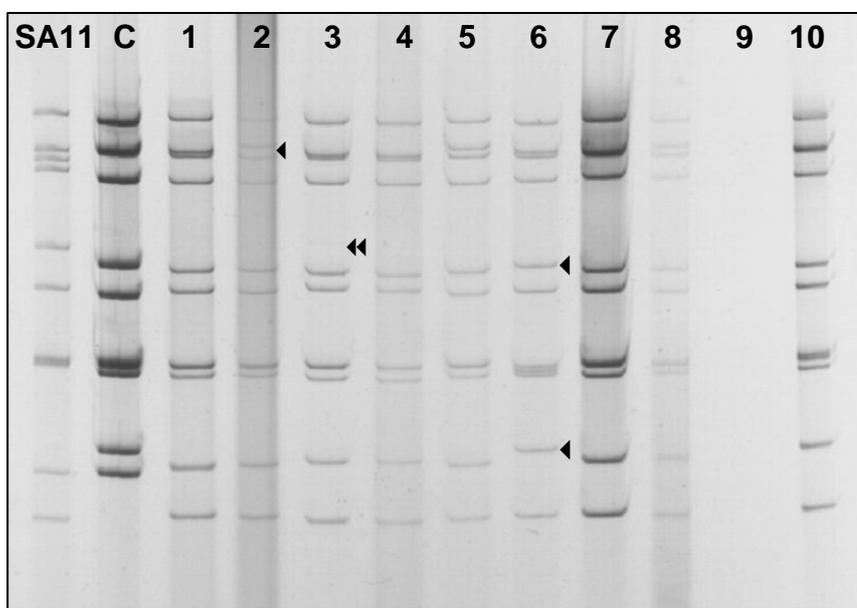


Figura 5. Ocorrência do tipo G1 de rotavírus em 148 crianças no decorrer de onze anos de estudos em gastroenterites virais em Belém, Pará, Brasil.

## 6.2. DETERMINAÇÃO DOS ELETROFEROTIPOS PELA EGPA

Das 148 amostras analisadas, em 116 (78,4%) pôde-se caracterizar o perfil eletroforético pela EGPA, sendo que o padrão longo foi encontrado em todos esses espécimes. Foram identificadas três variedades de eletroferotipos longo (L1, L2 e L3), com base na diferença da migração dos segmentos genômicos 2, 5 e 10. Quando se compararam as variedades L1 e L2, verificou-se que o segmento 2 da variedade L2 migrou mais lentamente que o seu correlato L1. Em relação à L3, observaram-se diferenças de migração entre os segmentos 5 e 10, em comparação à L1. Encontrou-se um segmento extra em uma amostra que apresentava o perfil L1, pertencente ao estudo com a vacina RRV-TV (Figura 6).



Linhas: SA11 – protótipo com perfil longo; C- controle com perfil curto; 1, 3, 4, 7 e 10 – amostras com perfil L1; 2, 5 e 8 - amostras com perfil L2; 6 - amostra com perfil L3; 9 - amostra não caracterizada (◄ principais diferenças na migração dos segmentos; ◄◄ segmento extra)

Figura 6. Perfis eletroforéticos de rotavírus em gel de poliacrilamida.

As amostras da Vigilância Epidemiológica exibiram o maior índice de eletroferotipos identificados (96,0%). Em contrapartida, o estudo Longitudinal foi o que teve a menor taxa (33,3%). Detectou-se a variedade L1 em maior frequência nos estudos, com exceção do Hospital Sentinela, em que prevaleceu a L2 (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição dos perfis eletroforéticos associados com o tipo G1 de rotavírus.

Projeto	Nº de amostras submetidas a EGPA	Nº de amostras de acordo com a variedade do eletroferotipo			
		L1	L2	L3	NC*
Longitudinal	9	3	-	-	6
RRV-TV	44	28	1	1	14
Nosocomial	14	7	2	-	5
Sentinela	31	7	16	3	5
Vigilância	50	47	1	-	2
Total	148	92	20	4	32

NC\*: não caracterizada

### 6.3. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA SOROTIPO G DE ROTAVÍRUS

Um total de 89,9% (133/148) dos espécimes fecais reagiu com anticorpos monoclonais específicos para tipos G de rotavírus. Os sorotipos G1, G9 e G1+G4

foram detectados em 117 (88,0%), 13 (9,8%) e 3 (2,2%) amostras, respectivamente. Houve correlação entre genótipo G1 detectado pela nested-PCR e sorotipo determinado por EIE em 79,0% das amostras comparadas. Todos os espécimes que pertenceram ao sorotipo G9 se detectaram no projeto Vigilância Epidemiológica.

A Tabela 5 sumaria a caracterização das 148 amostras analisadas pela EGPA, EIE e Nested-PCR para o gene VP7.

Tabela 5. Eletroferotipos, sorotipos e genótipos G de rotavírus em 148 amostras de rotavírus distribuídas nos projetos analisados.

EF, ST, GN	Projetos					Total
	Longitudinal	RRV-TV	Nosocomial	Sentinela	Vigilância	
EF						
L1	3	28	7	7	47	92
L2	-	1	2	16	1	20
L3	-	1	-	3	-	4
NC	6	14	5	5	2	32
ST						
G1	5	42	10	27	33	117
G1+G4	1	-	1	1	-	3
G9	-	-	-	-	13	13
NT	3	2	3	3	4	15
GN						
G1	8	44	14	31	50	147
G1+G4	1	-	-	-	-	1

EF: eletroferotipo  
ST: sorotipo  
GN: genótipo

NC: não caracterizada  
NT: não tipada

#### 6.4. GENOTIPAGEM PARA OS TIPOS G E P DE ROTAVÍRUS

Em relação ao tipo G, 147 (99,3%) amostras denotaram o tipo G1 e em apenas uma se detectou a infecção mista G1+G4, a qual fazia parte do estudo Longitudinal. Não foi observada nenhuma co-infecção com rotavírus animais.

Os produtos da amplificação pela nested-PCR do gene VP7 podem ser visualizados na Figura 7.

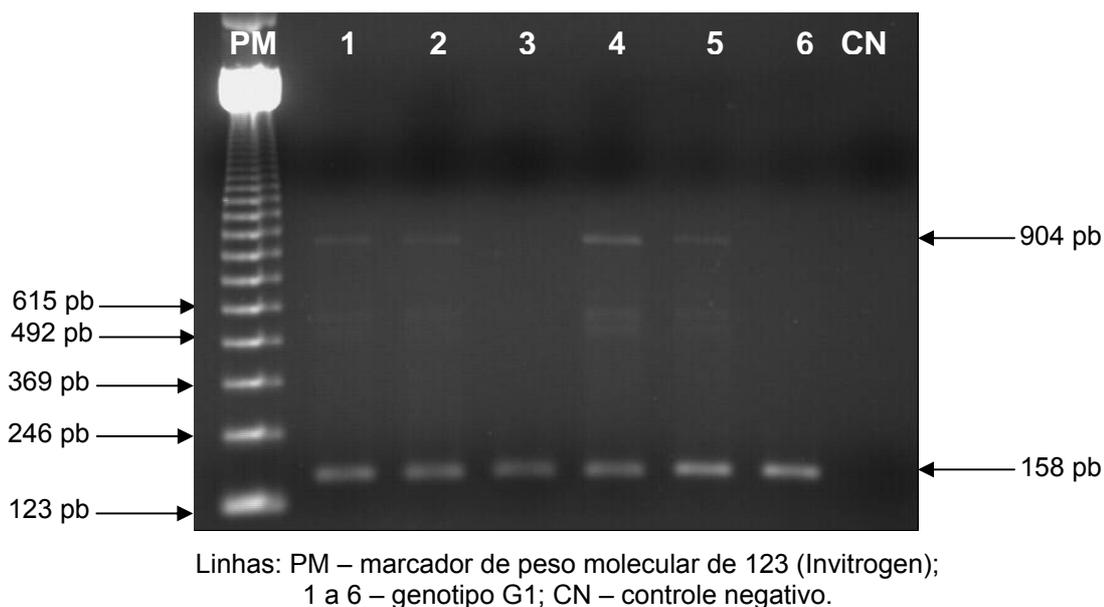
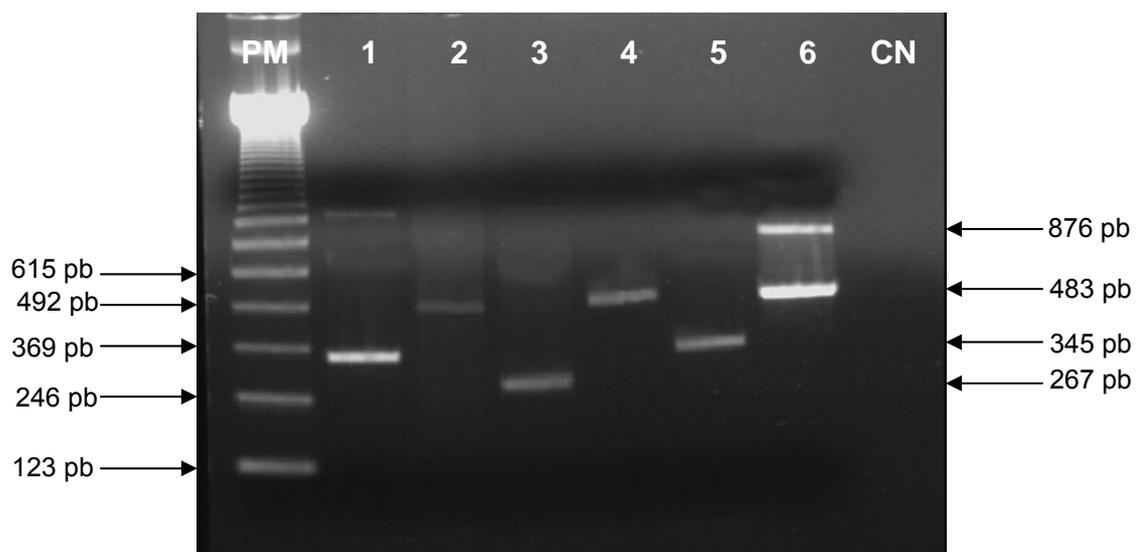


Figura 7: Nested-PCR para determinação do genotipo G1 de rotavírus

Dos 148 espécimes testados pela RT e Nested-PCR foi possível a determinação do tipo P em 130 (87,8%), sendo que o genótipo P[8] predominou (72,3%). Das 36 amostras restantes, 11 (8,5%) eram P[6]+P[8], 11 (8,5%) P[4]+P[8], 6 (4,6%) P[6], 4 (3,1%) P[4], 3 (2,3%) P[4]+P[6], e 1 (0,7%) P[4]+P[6]+P[8].

A Figura 8 demonstra os produtos da amplificação da Nested-PCR do gene VP4.



Linhas: PM – marcador de peso molecular de 123 (Invitrogen); 1 e 5 – genótipo P[8]; 2, 4 e 6 – genótipo P[4]; 3 – genótipo P[6]; CN – controle negativo.

Figura 8. Nested-PCR para determinação do genótipo P de rotavírus

A combinação binária dominante foi P[8],G1 concorrendo com 72,3% das infecções. Em 26 (20,0%) espécimes identificaram-se as infecções mistas, assim caracterizadas: 11 (8,5%) eram P[4]+P[8],G1, 10 (7,7%) P[6]+P[8],G1, 3 (2,4%) P[4]+P[6],G1, 1 (0,7%) P[4]+P[6]+ P[8],G1 e 1 (0,7%) P[6]+ P[8],G1+G4. Os genótipos incomuns, tais como P[6],G1 e P[4]G1 foram encontrados com frequência de 4,6% e 3,1%, respectivamente.

A Tabela 6 sintetiza a caracterização dos genótipos G e P das 130 amostras fecais, de acordo com os projetos analisados.

Tabela 6. Combinação binária envolvendo os genótipos G e P de rotavírus em 130 crianças.

Combinações Binárias	Projetos					Total
	Longitudinal	RRV-TV	Nosocomial	Sentinela	Vigilância	
P[8],G1	2	20	5	21	46	94
P[4],G1	-	1	1	2	-	4
P[6],G1	-	3	3	-	-	6
P[4]+[6],G1	-	1	-	2	-	3
P[4]+[8],G1	-	8	2	1	-	11
P[6]+[8],G1	1	7	-	2	-	10
P[6]+P[8],G1+G4	1	-	-	-	-	1
P[4]+[6]+[8],G1	-	1	-	-	-	1
Total	4	41	11	28	46	130

A Tabela 7 demonstra a caracterização dos eletroferotipos e genótipos G e P em 105 espécimes fecais. A combinação G1P[8] apresentando o eletroferotipo L1 foi registrada em 62,8% das amostras.

Tabela 7. Caracterização de eletroferotipos e genótipos G e P de rotavírus em 105 espécimes fecais.

Combinções Binárias	Eletroferotipos			Total
	L1	L2	L3	
P[8],G1	66	13	2	81
P[4],G1	2	1	-	3
P[6],G1	1	1	-	2
P[4]+[6],G1	1	-	1	2
P[4]+[8],G1	6	1	-	7
P[6]+[8],G1	7	1	1	9
P[4]+[6]+[8],G1	1	-	-	1
Total	84	17	4	105

## 6.5. RESULTADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os 148 espécimes fecais incluídos neste estudo foram coletados ao longo de 11 anos, originados de cinco projetos de pesquisas em gastroenterites virais. Em relação à frequência de rotavírus G1, registre-se que foi responsável por 25,0% (9/36), 48,8% (44/90), 29,2% (14/48), 11,0% (31/281) e 67,6% (212/343) das infecções nos estudos Longitudinal, com a vacina RRV-TV, Nosocomial, Hospital Sentinela e Vigilância Epidemiológica, respectivamente (Figura 9).

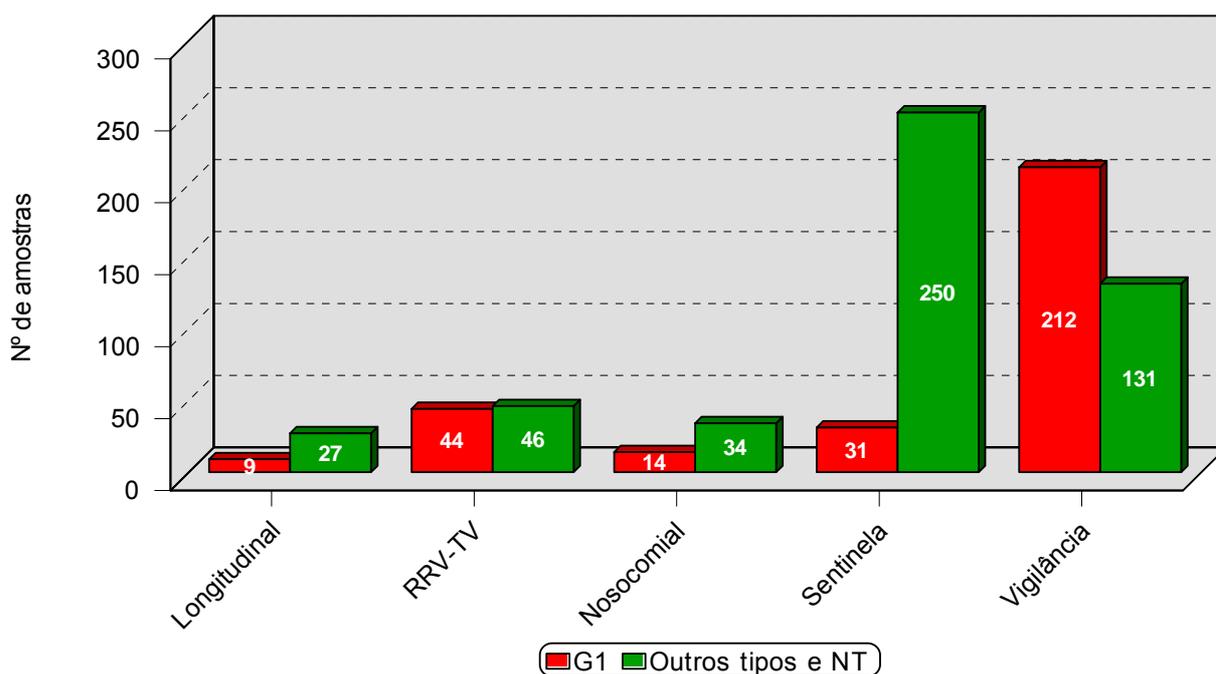


Figura 9. Frequência do tipo G1 de rotavírus em 148 crianças de acordo com os estudos em gastroenterites virais em Belém, Pará, Brasil.

Os rotavírus do tipo G1 foram detectados entre junho de 1983 a setembro de 2003, também circulando ao longo de todos os trimestres dos anos de 1991, 1994 e 1999. Observou-se uma prevalência nos meses de julho a setembro dos anos de 1991, 1994 e 2003. Cabe ressaltar que as amostras do projeto Vigilância Epidemiológica foram coletados apenas no período de março a outubro de 2006 (Figura 10).

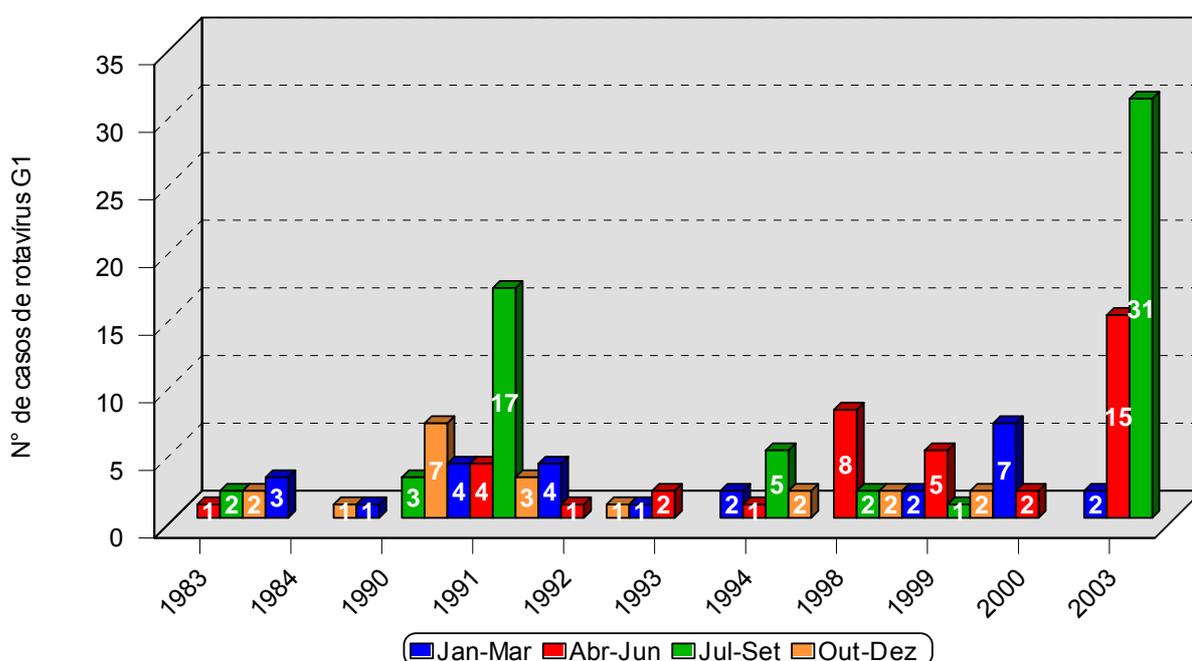


Figura 10. Distribuição trimestral de rotavírus G1 em 148 crianças no decorrer de onze anos de estudos em gastroenterites virais em Belém, Pará, Brasil.

O tipo G1 foi encontrado infectando crianças na faixa etária de 2 aos 35 meses. Crianças com idade superior aos 2 anos foram registradas apenas nos estudos Nosocomial e Vigilância Epidemiológica. Foi detectado maior número de casos na faixa compreendida entre 6 a 16 meses de idade (Figura 11).

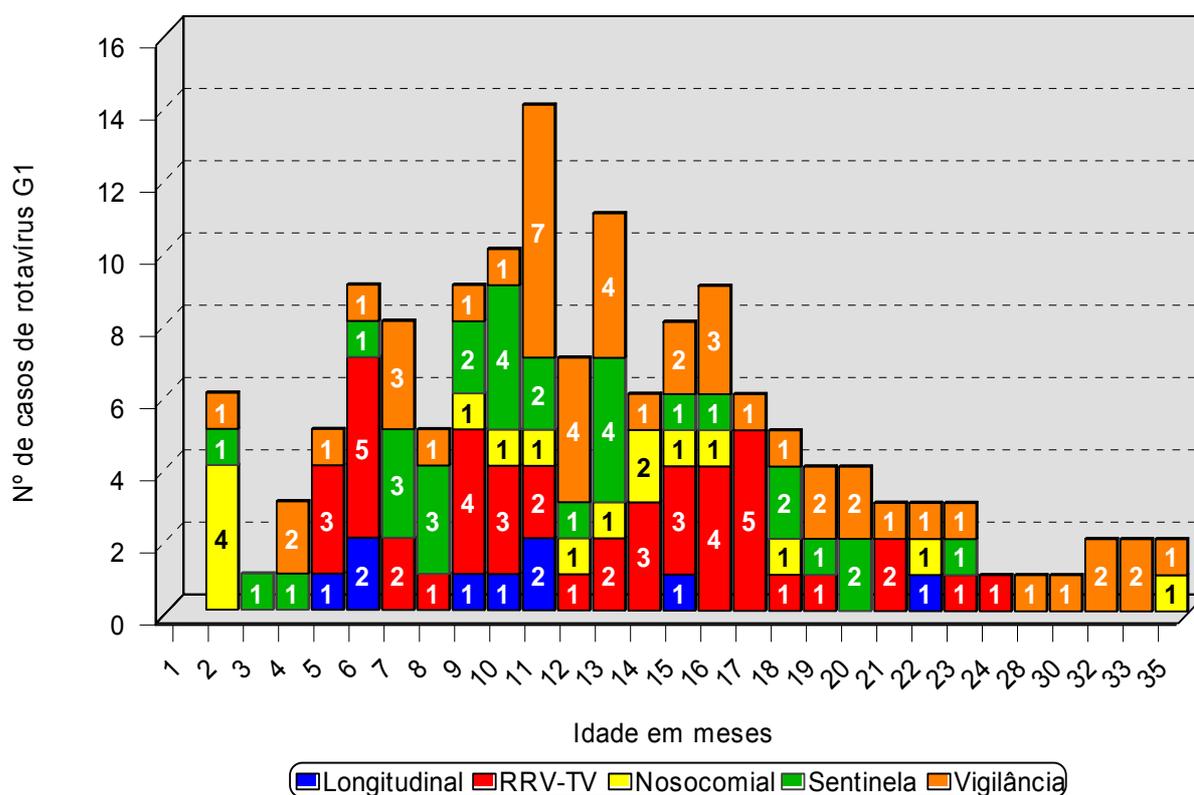


Figura 11. Distribuição de rotavírus G1 em 148 crianças participantes de cinco estudos em gastroenterites virais de acordo com a idade em Belém, Pará, Brasil.

A distribuição temporal das infecções por rotavírus relacionados ao gene VP4, ao longo dos 11 anos de estudo, é demonstrada na Figura 12. Denotou-se o tipo P[8] em expressiva frequência e registrado em todos esses anos, com exceção de 1984, o qual não foi tipado nenhum genotipo P. As infecções mistas P[4]+[8] e P[6]+[8] foram registradas em vários anos.

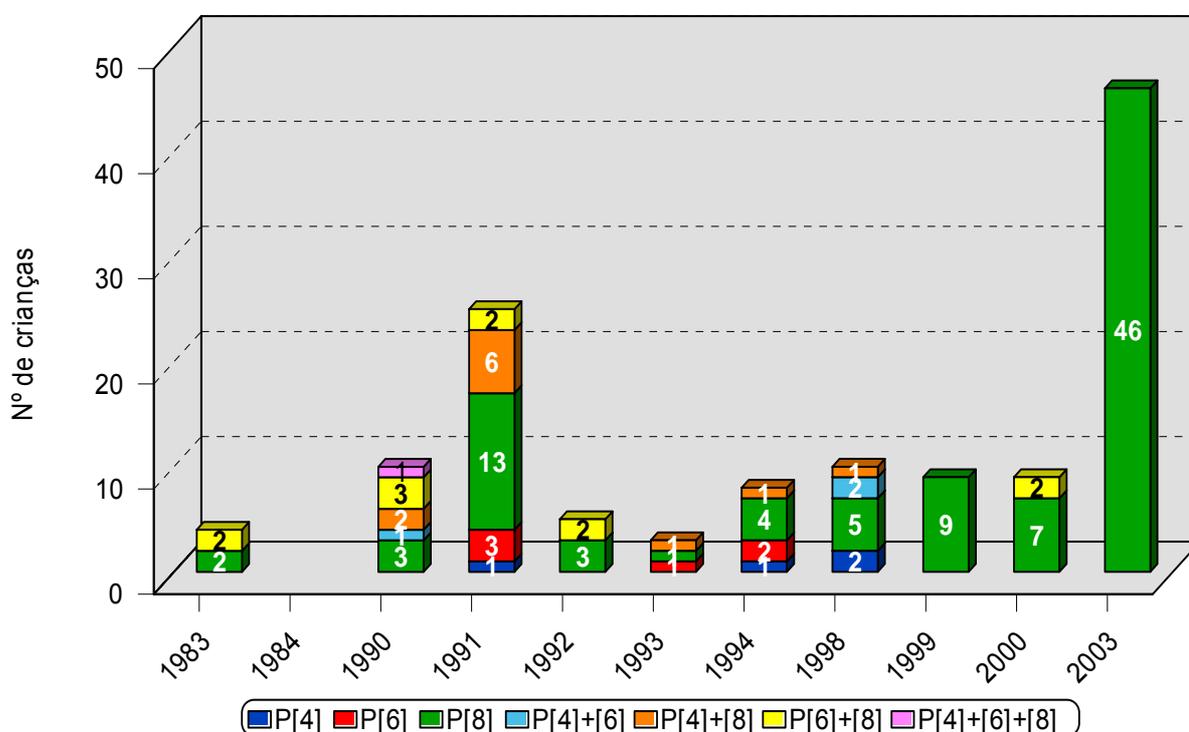


Figura 12. Distribuição temporal de rotavírus G1 relacionadas ao gene VP4 em 130 crianças no decorrer de onze anos de estudos em gastroenterites virais em Belém, Pará, Brasil.

No que concerne à ocorrência do genotipo P em relação à idade, P[8] circulou entre o 2º e 35º meses de idade. As infecções mistas P[4]+P[8] e P[6]+P[8] foram observadas em várias faixas etárias. Ainda foram registrados casos esporádicos de P[6] e P[4], três casos de P[4]+P[6] e um de P[4]+P[6]+P[8] (Figura 13).

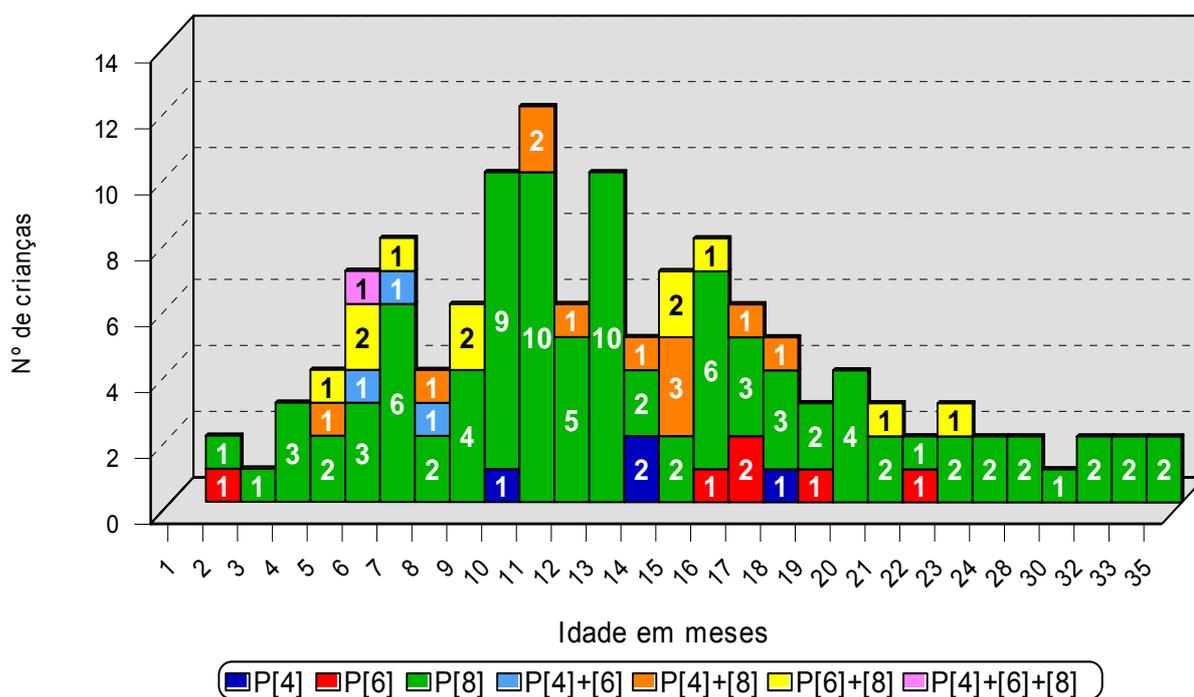


Figura 13. Distribuição de genótipos P em 130 crianças participantes de cinco estudos em gastroenterites virais de acordo com a idade em Belém, Pará, Brasil.

## 6.6. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Os principais sintomas clínicos da doença diarréica associados ao rotavírus do tipo G1, comparados com outros tipos são demonstrado na Tabela 8. Não se configurou qualquer diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros clínicos e as variedades genotípicas de rotavírus. Os casos do estudo Vigilância Epidemiológica não participaram da análise em relação ao número de evacuações, uma vez que não se obteve dados a respeito de tal sintoma.

Tabela 8. Comparação das manifestações clínicas entre episódios de diarréia por rotavírus G1 e rotavírus não G1 em crianças menores de 5 anos de idade.

Manifestações Clínicas	Rotavírus G1 (n=90)	Rotavírus não G1* (n=64)	Valor de p
Nº evacuações**	4,5	4,6	0,79
Vômitos (%)	79,1	90,6	0,12
Febre (%)***	76,9	70,3	0,46

\* Tipos G2, G4 e G9.

\*\*nº de evacuações médio/dia

\*\*\*temp. axilar  $\geq 38^{\circ}\text{C}$

A Tabela 9 demonstra as manifestações clínicas relatadas em 129 casos de diarreia, considerando-se os diversos estudos em gastroenterites virais analisados. Os pacientes do estudo Vigilância Epidemiológica apresentaram a maior frequência de vômitos. Em relação ao tipo de reidratação, as crianças do estudo Hospital Sentinela foram as que mais necessitaram de reidratação oral, entretanto, a via parenteral predominou no estudo Vigilância Epidemiológica, envolvendo 44,0% das 50 crianças analisadas.

Tabela 9. Frequência das manifestações clínicas e tipo de reidratação em 129 episódios de diarreia por rotavírus G1 em relação aos estudos em gastroenterites virais.

Projetos	Manifestações clínicas			Tipo de reidratação		
	Nº evacuações*	Vômitos (%)	Febre (%)**	Oral	IV	Ambas
Longitudinal (n=9)	5	55,5	100,0		NI***	
RRV-TV (n=25)	4	68,0	72,0		NI	
Nosocomial (n=14)	6	85,7	64,2	7,2	21,4	71,4
Hosp. Sentinela (n=31)	4	76,4	80,6	48,4	19,3	32,3
Vigilância (n=50)	NI	92,0	82,0	6,0	44,0	50,0

\*nº de evacuações médio/dia

\*\*temp. axilar  $\geq 38^{\circ}\text{C}$

\*\*\*NI: não informado

IV: Intravenosa

## 7. DISCUSSÃO

A presente análise assume um caráter pioneiro no Brasil, permitindo ampliar os conhecimentos acerca da diversidade antigênica e molecular das infecções pelo tipo G1 de rotavírus. A par disso, denotaram-se aspectos epidemiológicos importantes das infecções por esse genotipo em Belém, Pará. Tais observações poderão contribuir para analisar a prevalência do tipo G1 antes da introdução da vacina RIX 4414, uma vez que tal acontecimento poderá induzir seleção de algumas amostras e conseqüentemente gerar o escape de estirpes mutantes, então investigações ulteriores deverão ser realizadas para verificar a circulação ou emergência de novos genotipos.

O genotipo G1 encontra-se circulando em várias partes do mundo em diferentes prevalências. Nos países desenvolvidos, como os que compõem a Austrália, Oceania e América do Norte, são registradas as maiores freqüências (70,4% -73,3%). Por outro lado, nos países em desenvolvimento, principalmente os localizados na África e América do Sul, esses percentuais são menores (35,7% - 57,5%). Esta configuração está possivelmente relacionada à circulação de amostras não usuais, assim como a emergência de novos tipos nos países mais pobres (Gentsch *et al.*, 2005; Santos e Hoshino, 2005).

Detectou-se o tipo G1 a partir dos espécimes fecais de crianças com diarreia ao longo de onze anos, configurando as diferentes abordagens nas populações alvo. Observou-se uma prevalência global de 41,3%, índice semelhante ao registrado por Volotão *et al.* (2006), uma vez que o genotipo G1 foi detectado em

49,6% das crianças com diarreia aguda na cidade do Rio de Janeiro. Parra *et al.* (2005) em uma investigação conduzida no Paraguai entre os anos de 1998 a 2000 detectaram este genotipo em 17,2% dos espécimes. Este achado divergente em relação à presente investigação está associado à prevalência do tipo G4, bem como a detecção do tipo G9 entre as amostras analisadas no Paraguai.

Registrou-se uma variação de 11,0% a 67,6% na frequência de rotavírus no decorrer dos estudos analisados, sendo que o Hospital Sentinela denotou a menor taxa de infecções pelo rotavírus G1. Este resultado provavelmente se relaciona ao alto índice de amostras não tipadas, bem como a emergência do tipo G9 no decorrer deste estudo. Santos *et al.*, 2005 registraram a prevalência de 78,8% do G9 entre crianças hospitalizadas com diarreia em Salvador, período semelhante ao que foi conduzido o estudo Hospital Sentinela. Costa *et al.*, 2004 detectaram o tipo G9 em 34,4% das amostras de rotavírus em Goiás. Estes resultados configuram a vasta circulação deste genotipo no Brasil

A caracterização dos eletroferotipos, sorotipos G e genotipos P dos rotavírus G1 evidenciou a variabilidade genética inerente a esses agentes virais. Das 148 amostras analisadas, 116 (78,4%) denotaram nítidos eletroferotipos, em 133 (89,9%) identificaram-se os sorotipos e em 130 (87,8%) caracterizaram-se os genotipos P.

Verificou-se que o maior índice de amostras nas quais não foi possível a determinação do eletroferotipo ocorreu no estudo Longitudinal, uma vez que apenas 33,3% dos espécimes foram caracterizados. Este achado possivelmente se associa

ao tempo de coleta das amostras (mais de 20 anos) oferecendo um menor número de partículas virais para análise pela EGPA. Tal limitação, todavia, parece não ter interferido na amplificação do genoma viral pela RT-PCR, fato provavelmente associado a maior sensibilidade do procedimento, não obstante a esperada degradação do ácido nucléico ao longo dos anos.

Vale assinalar a correlação de 100,0% entre o genotipo G1 e o eletroferotipo longo detectados na análise em questão, apesar da extensa diversidade encontrada. Luz *et al.*, (2005) registraram em 19,0% dos espécimes com especificidade G1 apresentaram o perfil curto. Este fato está possivelmente relacionado à ocorrência de rearranjos na comunidade investigada.

Na presente investigação se observou que em 116 espécimes fecais, nas quais se analisaram o perfil eletroforético, apenas emergiu o padrão longo. Foram identificadas três variedades desse eletroferotipo, demonstrando a variedade genética circulando nesta região. Cabe ressaltar que essas três variedades foram encontradas entre os espécimes do estudo com a vacina RRV-TV e Hospital Sentinela, concomitantemente à detecção de diversas amostras não usuais. Luz *et al.* (2005) detectaram duas variedades de eletroferotipos longos e três curtos circulando entre crianças com diarreia por rotavírus no Maranhão. Em outra investigação, na Hungria, registraram-se quatro variedades, no entanto, os espécimes apresentavam especificidade P[8],G9, sugerindo rearranjos genéticos entre as cepas circulantes (Bányai *et al.*, 2004a).

Observou-se uma correlação entre genotipo e sorotipo G1 em 79,0% dos espécimes fecais testados. Essa falha em caracterizar o tipo G1 pelo EIE possivelmente se associa à presença de reações cruzadas com os sorotipos G9 e G4, bem como a impossibilidade em detectar antígenos para o tipo G1 devido à pequenas quantidades de moléculas de VP7. Coulson *et al.* (1999) relataram este problema potencial envolvendo reação cruzada entre sorotipos. Arista *et al.* (2005) analisaram 38 amostras reagindo com o sorotipo G4 e, posteriormente, pela PCR, verificaram que em 14 espécimes se configuraram a especificidade G9. Santos e Hoshino (2005) registraram frequências de amostras não tipadas variando de 8,0% a 46,2% ao analisarem estudos realizados em várias partes do mundo. Esta questão se deve aos diversos mecanismos de variação genética, resultando em falha do reconhecimento pelos anticorpos monoclonais utilizados no EIE e a menor sensibilidade desse teste em comparação à PCR.

Ainda que na presente análise apenas uma mistura entre os tipos G1 e G4 tenha sido registrada, e nenhuma infecção envolvendo rotavírus oriundos de animais observada, pesquisas prévias já denotaram tais características. Kebaabetswe *et al.* (2005), em uma investigação realizada em Botsuana envolvendo crianças com gastroenterite, detectaram as infecções mistas G1+G2, G1+G8 e G1+G3+G9 em 5,6%, 22,0% e 5,6%, respectivamente. Santos *et al.*, (1999) ao analisarem espécimes de suínos verificaram a presença de misturas dos tipos G1 e G5 em uma amostra.

No que concerne à caracterização do gene VP4 pela RT e nested-PCR, revelou-se possível a detecção em 87,8% dos espécimes fecais testados. Este

percentual foi similar ao registrado por Santos *et al.* (2003) entre crianças menores de cinco anos com diarreia aguda, cuja frequência foi de 84,0%. Não obstante, o alto índice de amostras caracterizadas para o tipo P, seria digno de interesse levar-se a efeito novas pesquisas envolvendo outras técnicas a fim de diminuir este percentual de amostras não tipadas.

A ocorrência dos tipos P[8], P[6] e P[4] foi de 72,3%, 4,6% e 3,1% nas infecções, respectivamente. Bányai *et al.* (2005), em um estudo na Hungria envolvendo crianças hospitalizadas com gastroenterite, registraram os seguintes percentuais: 89,9% dos casos eram P[8], 0,7% P[6] e 3,0% P[4]. É importante salientar que na investigação na Hungria envolveu pesquisa de vários tipos G, tais como G2, G3, G4, G6 e a ocorrência de G9, ao passo que no presente estudo engloba apenas o tipo G1.

Com relação à caracterização das combinações binárias, o genotipo P[8],G1 concorreu com 72,3% das infecções e circulou na faixa etária de 2 a 35 meses de idade. Este genotipo é amplamente encontrado circulando em várias partes do mundo (Santos e Hoshino, 2005). Gentsch *et al.* (2005) analisaram vários estudos realizados na América Latina e verificaram que esta combinação ocorreu em 52,0% das infecções por rotavírus. Carmona *et al.* (2006) detectaram P[8]G1 em 66,6% dos espécimes coletados durante oito anos de vigilância das infecções por rotavírus em São Paulo.

É importante destacar a frequência de 20,0% de infecções mistas registradas nessa investigação, das quais 8,5% eram P[4]+P[8],G1, 7,7%

P[6]+P[8],G1, 2,4% P[4]+P[6],G1, 0,7% P[4]+P[6]+P[8],G1 e 0,7% P[6]+ P[8],G1+G4. Das *et al.* (2004) detectaram, em um estudo com crianças hospitalizadas na Índia, o percentual de 30,0% de amostras apresentando infecções mistas, apesar de que nesta pesquisa foram encontradas mais variedades de tais tipos de infecções. Esses altos índices são encontrados principalmente nos países em desenvolvimento e resultam do rearranjo entre os genes dos rotavírus, suscitando o escape da ação do sistema imunológico bem como a introdução de novos tipos G e P desse agente viral.

Tal como ocorre nas infecções mistas, uma vez que são responsáveis pelo aumento da diversidade dos tipos de rotavírus, as combinações não usuais do mesmo modo desempenham importante papel. No presente estudo, as infecções não usuais P[4],G1 e P[6],G1 ocorreram em 4,6% e 3,1% dos casos, respectivamente. Abdel-Haq *et al.* (2003) detectaram a prevalência do tipo P[4],G1 em 41,0% das infecções por rotavírus entre crianças hospitalizadas em Detroit, EUA. O alto índice desta combinação não usual nesta investigação provavelmente está relacionado à migração de diversos grupos étnicos resultando na possível introdução do tipo P[4],G2 de outras partes do mundo.

Estudos anteriores demonstraram que o genotipo P[6] está associado tanto com infecções assintomáticas em neonatos como sintomáticas em crianças jovens (Linhares *et al.*; 2002; Steele e Ivanoff, 2003; Banyái *et al.*, 2004b; Mascarenhas *et al.*, 2006). Registrou-se o tipo P[6],G1 em 4,6% das crianças com diarreia aos 2, 16, 17, 19 e 22 meses de idade. Doan *et al.* (2003) detectaram este genotipo em 2,0% das crianças hospitalizadas com gastroenterite por rotavírus.

No tocante à comparação das características clínicas associadas ao G1 e a outros tipos de rotavírus, não se verificou diferença quanto à gravidade entre as variedades genotípicas. Estes achados corroboram a pesquisa realizada por Nakagomi *et al.* (2006), já que não verificaram diferenças significativas relacionadas à virulência dos principais tipos de rotavírus, ainda que alguns estudos enfatizem o envolvimento do tipo G9 associado a casos mais graves de diarreia (Santos e Hoshino, 2005; Linhares *et al.*, 2006). Apesar disso, estudos acerca deste parâmetro devem ser conduzidos posteriormente.

Em relação aos sintomas clínicos relatados neste estudo, a frequência de vômitos e febre entre os pacientes variou de 55,5 a 92,0% e 94,2 a 100,0% entre os estudos, respectivamente. É importante destacar que a maior frequência da reidratação oral foi encontrada entre os pacientes do estudo Hospital Sentinela, isto porque tais crianças eram atendidas em ambulatórios ou hospitais. Outra informação considerável está relacionada à frequência de reidratação parenteral entre pacientes da Vigilância Epidemiológica, cujo percentual foi de 44,0%, provavelmente devido à situação de maior gravidade nos casos envolvendo hospitalizações.

É de extrema importância, então, uma constante vigilância das amostras de rotavírus circulantes, especialmente em países em desenvolvimento. Além disso, pesquisas futuras proporcionarão um melhor entendimento sobre epidemiologia molecular deste genotipo e a dinâmica da transmissão dos rotavírus no Brasil.

## 8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- ↪ Os rotavírus do tipo G1 foram detectados em 41,3% (330/798) das crianças infectadas por rotavírus ao longo de onze anos de pesquisa em gastroenterites virais;
- ↪ Em relação à frequência dos rotavírus G1, esta variou de 11,0% a 67,6% entre os estudos;
- ↪ A caracterização dos eletroferotipos, sorotipos G e genótipos P de rotavírus G1 ocorreram em frequências de 78,4%, 89,9% e 87,8%, respectivamente;
- ↪ Identificaram-se três variedades de eletroferotipos longo, sendo que a variedade L1 foi encontrada com maior frequência (79,3%);
- ↪ Detectou-se a infecção mista G1+G4 em uma amostra e não foi observada qualquer co-infecção com rotavírus de origem animal;
- ↪ Os genótipos incomuns circularam com frequência de 7,7%;
- ↪ Infecções mistas foram encontradas em percentual bastante expressivo (20,0%);
- ↪ Foi registrado maior número de casos de infecção por rotavírus G1 na faixa compreendida entre 6 a 16 meses de idade;
- ↪ Não se verificou diferença de gravidade entre as variedades genotípicas G1 e outros tipos de rotavírus;
- ↪ Os resultados obtidos nessa análise demonstram a diversidade molecular que os rotavírus G1 apresentam, no entanto, estudos posteriores, utilizando outras técnicas, como seqüenciamento de ácidos nucléico e *microarray*, permitirão analisar e entender mais profundamente a complexidade genética de desses agentes e o impacto que tais mudanças geram em relação à eficácia da vacina anti-rotavírus utilizada em nosso País.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAP, CID (American Academy of Pediatrics, Committee on Infectious Diseases). **Prevention of rotavirus disease: guidelines for use rotavirus vaccine.** *Pediatrics*, Dez. 1998, v.102, n.6, p.1483-1491,

ABDEL-HAQ, N. M. *et al.* **Increased prevalence of G1P[4] genotype among children with rotavirus-associated gastroenteritis in metropolitan Detroit.** *J. Clin. Microbiol.*, Jun. 2003, v.41, n.6, p.2680-2682.

ALFIERI, A. A. *et al.* **Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence.** *Arch. Virol.*, 1996, v.141, n.12., p.2353-2364.

ARAÚJO, I. T. *et al.* **Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil.** *J. Clin. Microbiol.*, Maio 2001, v.39, n.5, p.1999-2001.

ARISTA, S. *et al.* **Genetic variability among G4 Italian human rotaviruses.** *J. Clin. Microbiol.*, Mar. 2005, v.43, n.3, p.1420-1425.

BALL, J. M. *et al.* **Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein.** *Science*, Abr. 1996, v.272, n.5258, p.101-104.

BALL, J. M. *et al.* **Rotavirus NSP4: a multifunctional viral enterotoxin.** *Viral Immunol.*, 2005, v.18, n.1, p.27-40.

BÁNYAI, K. *et al.* **Detection of human rotavirus serotype G6 in Hungary.** *Epidemiol. Infect.*, Fev. 2003, v.130, n.1, p.107-112.

BÁNYAI, K. *et al.* **Molecular epidemiology of human P[8],G9 rotaviruses in Hungary between 1998 and 2001.** *J. Med. Microbiol.*, Ago. 2004, v. 53, n.Pt 8, p.791-801a.

BÁNYAI, K. *et al.* **Sequencing and phylogenetic analysis of human genotype P[6] rotavirus strains detected in Hungary provides evidence for genetic heterogeneity within the P[6] VP4 gene.** *J. Clin. Microbiol.*, Set. 2004, v.42, n.9, p.4338-4343b.

BÁNYAI, K. *et al.* **Dominating prevalence of P[8],G1 and P[8],G9 rotavirus strains among children admitted to hospital between 2000 and 2003 in Budapest, Hungary.** *J. Med. Virol.*, Jul. 2005, n.76, v.3, p.414-423.

BASS, D. M. **Interferon gamma and interleukin 1, but not interferon alpha, inhibit rotavirus entry into human intestinal cell lines.** *Gastroenterology*, Jul. 1997, v.113, n.1, p.81-89.

BEROIS, M. *et al.* **Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2.** *J Virol.*, Fev. 2003, v.77, n.3, p.1757-1763.

BERN, C. *et al.* **The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update.** *Bull. World. Health Org.*, 1992, v.70, n.6, p.705-714.

BERNSTEIN, D. I. *et al.* **Efficacy of live, attenuated, human rotavirus vaccine 89-12 in infants: a randomised placebo-controlled trial.** *Lancet*, Jul. 1999, v.354, n.9175, p.287-290.

BISHOP, R. F. *et al.* **Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis.** *Lancet*, 1973, v.2, n.7841, p.1281-1283.

BISHOP, R. F. *et al.* **Serum, fecal & breast milk rotavirus antibodies as indices in mother-infant pairs.** *J. Infect. Dis.*, Set. 1996, v.174, Supl. 1, p.S-22-S29.

BOOM, R. *et al.* **Rapid and simple method for purifications of nucleic acids.** *J. Clin. Microbiol.*, Mar. 1990, v.28, n.3, p.495-503.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doença diarreica por rotavírus: Vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano – VORH.** Informe técnico, 2006, p 1-36.

BRASIL. **Rotavírus: vacina evita 850 óbitos de bebês por ano.** Disponível em <[http://www.brasil.gov.br/noticias/ultimas\\_noticias/24263\\_saude\\_060306](http://www.brasil.gov.br/noticias/ultimas_noticias/24263_saude_060306)>. Acesso em: 10 abr. 2006.

BRESEE, J. S. *et al.* **Update on rotavirus vaccines.** *Pediatr. Infect. Dis. J.*, Nov. 2005, v.24, n.11, p.947-952.

BRYCE, J. *et al.* **WHO estimates of the causes of death in children.** *Lancet*, Mar./Abr. 2005, v.365, n. 9465, p.1147-1152.

CARDOSO, D. D. *et al.* **Epidemiological features of rotavirus infection in Goiania, Goias, Brazil, from 1986 to 2000.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Jan. 2003, v.98, n.1, p.25-29.

CARMONA, R. C. *et al.* **Characterization of rotavirus strains from hospitalized and outpatient children with acute diarrhoea in São Paulo, Brazil.** *J. Med. Virol.*, Set. 2004, v.4, n.1, p.166-172.

CARMONA, R. C. *et al.* **Human rotavirus serotype G9, Sao Paulo, Brazil, 1996-2003.** *Emerg. Infect. Dis.*, Jun. 2006, v.12, n.6, p.963-968.

CARNEIRO, N. B. *et al.* **Clinical and epidemiological aspects of children hospitalized with severe rotavirus-associated gastroenteritis in Salvador, BA, Brazil.** *Braz. J. Infect. Dis.*, Dez. 2005, v.9, n.6, p.525-528.

CASTELLO, A. A., *et al.* **Molecular epidemiology of group A rotavirus diarrhea among children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and emergence of the infrequent genotype G12.** *J. Clin. Microbiol.* Jun. 2006, v.44, n.6, p.2046-50.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation.** *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, Nov. 1999, v.48, n.43, p.1007.

CHEN, D. *et al.* **Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase.** *Virology*, Dez. 1999, v.265, n.1, p.120-130.

COLSON, B. S. *et al.* **Comparison of enzyme immunoassay and reverse transcriptase PCR for identification of serotype G9 rotaviruses.** *J. Clin. Microbiol.*, 1999, v.37, p.3187-3193.

COLUCHI, N. *et al.* **Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of rotavirus strains in children with acute diarrhea in Paraguay.** *J. Clin. Microbiol.*, Maio 2002, v.40, n.5, p.1709-1714.

COOK, S. M. *et al.* **Global seasonality of rotavirus infections.** *Bull. World Health Org.*, 1990, v.68, n.2, p.171-177.

COSTA, P. S. *et al.* **Rotavirus A infections and reinfections: genotyping and vaccine implications.** *J. Pediatr.*, Mar. 2004, v.80, n.2, p.119-122.

CUNLIFFE, N. A. *et al.* **Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999.** *J. Clin. Microbiol.*, Mar. 2001, v.39, n.3, p.836-843.

DAS, B. K. **Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India.** *J. Clin. Microbiol.*, Jul.1994, v.32,n.7, p.1820-1822.

DAS, S. *et al.* **Genetic variability of human rotavirus strains isolated from Eastern and Northern India.** *J. Med. Virol.*, Jan. 2004, v.72, n.1, p.156-161.

DESSELBERGER, U. **Genome rearrangements of rotaviruses.** *Adv. Virus. Res.*, 1996, v.46, p.69-95.

DOAN, L. T. *et al.* **Epidemiological features of rotavirus infection among hospitalized children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam.** *J. Med. Virol.*, Abr. 2003, v.69, n.4, p.588-594.

ESTES, M. K. **Rotaviruses and their replication.** In: *Fields Virology* Editado por KNIPE, D. M. *et al.*, Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2001, p.1426-1454.

ESTES, M. K. *et al.* **Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis.** *Novartis Found Symp.*, 2001; v.238, p.82-96; discussão 96-100.

FLEWETT, T.H.; BRYDEN, A. S. e DAVIES, H. **Virus particles in gastroenteritis.** *Lancet*, Dez. 1973, v.2, n.7844, p.1497.

GENTSCH, J. R. *et al.* **Identification of group A rotavirus gene 4 types by Polymerase Chain Reaction.** *J. Clin. Microbiol.*, 1992; v.30, n.6, p.1365-1373.

GENTSCH, J. R. *et al.* **Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development.** *J. Infect. Dis.*, 1996, v.174, Supl.1, p.S30-S36.

GENTSCH, J. R. *et al.* **Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs.** *J. Infect. Dis.*, Set. 2005, v.192, Supl 1, p.S146-59.

GLASS, R. I. *et al.* **The epidemiology of rotavirus diarrhea in the United States: surveillance and estimates of disease burden.** *J. Infect. Dis.*, Set. 1996, v.174, Supl 1, p.S5-11.

GOUVEA, V. *et al.* **Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens.** *J. Clin. Microbiol.*, Fev. 1990, v.28, n.2, p.276-282.

GOUVEA, V.; SANTOS, N. e TIMENETSKY, M. C. S. T. **Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR.** *J. Clin. Microbiol.*, Maio 1994, v.32, n.5, p.1338-1340.

GUSMÃO, R. H. *et al.* **Nosocomial transmission of an avian-like rotavirus strain among children in Belem, Brazil.** *J. Diarrhoeal Dis. Res.*, Jun. 1994, v.12, n.2, p.129-132.

GUSMÃO, R. H. P. *et al.* **Rotaviruses as a cause of nosocomial, infantile diarrhoea in Northern Brazil.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Nov./Dez. 1995, v.90, n.6, p.743-749.

GUSMÃO, R. H. *et al.* **Rotavirus subgroups, G serotypes, and electrophoretotypes in cases of nosocomial infantile diarrhoea in Belém, Brazil.** *J. Trop. Pediatr.*, Abr. 1999, v.45, n.2, p.81-86.

HART, C. A.; CUNLIFFE, N. A. e BRESEE, J. S. **Diarrhoea caused by viruses.** In: *Manson's Tropical Diseases*. 21<sup>a</sup> ed. Editado por COOK, G. C. e ZUMIA, A. London: WB Saunders, 2002, p.823-830.

HERRING, A. J. *et al.* **Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels.** *J. Clin. Microbiol.*, Set. 1982, v.16, n.3, p. 473-477.

HOSHINO, Y. e KAPIKIAN, A. Z. **Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development.** *J. Health Popul. Nutr.*, Jun. 2000, v.18, n.1, p.5-14.

IBGE Cidades. **Banco de dados sobre informações de todos os municípios do Brasil.** Disponível em <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>. Acesso em: 10 abr. 2006.

ITURRIZA-GÓMARA, M. *et al.* **Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999.** *J. Virol.*, Abr. 2001, v.75, n.8, p. 3696-3705.

JAIN, V. *et al.* **Great Diversity of Group A Rotavirus Strains and High Prevalence of Mixed Rotavirus Infections in India.** *J. Clin. Microbiol.*, Out. 2001, v.39, n.10, p.3524-3529.

JAYARAM, H.; ESTES, M. K. e PRASAD, B. V. **Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication.** *Virus Res.*, Abr. 2004, v.101, n.1, p. 67-81.

JIANG, B.; GENTSCH, J. R. e GLASS, R. I. **The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview.** *Clin. Infect. Dis.*, Maio 2002, v.34, n.10, p.1351-1361.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y. e CHANOCK, R. M. **Rotaviruses.** In: *Fields Virology* Editado por KNIPE, D. M. *et al.*, Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2001, p. 1787-1833.

KEBAABETSWE, L. P. *et al.* **Detection and molecular characterisation of group a rotavirus from children in northern Botswana.** *East Afr. Med. J.*, Abr. 2005, v.82, n.4, p.203-208.

KUZUYA, M. *et al.* **An outbreak of acute gastroenteritis caused by human group C rotavirus in a welfare institution in Okayama prefecture.** *Jpn. J. Infect. Dis.*, Ago. 2005, v.58, n.4, p.255-257.

LEITE, J. P. G. *et al.* **Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis.** *Arch. Virol.*, 1996, v.141, n.12, p.2365-2374.

LINHARES, A. C. **Rotavirus infection in Brazil: epidemiology, immunity, and potential vaccination.** *Braz. J. infect. Dis.*, Dez. 1997, v.1, n.6, p.284-293.

LINHARES, A. C. **Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle.** *Cadern. Saúde Públ.*, Jul./Set. 2000, v.16, n.3, p.629-646.

LINHARES, A. C. e BRESEE, J. S. **Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America.** *Rev. Panam. Salud Publica*, Nov. 2000, v.8, n.5, p.305-331.

LINHARES, A. C. *et al.* **Duovirus (Rotavírus) em Belém do Pará, Brasil.** *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, Jul./Ago. 1977, v.19, n.4, p.278-279 (Nota Prévia).

LINHARES, A. C. *et al.* **Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil.** *Epidemiol. Infect.*, Fev. 1989, v.102, n.1, p.129-145.

LINHARES, A. C. *et al.* **Immunogenicity, safety and efficacy of tetravalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belém, Brazil.** *Bull. World Health Organ.*, 1996, v.74, n.5, p.491-500.

LINHARES, A. C. *et al.* **Reappraisal of the Peruvian and Brazilian lower titer tetravalent rhesus-human reassortant rotavirus vaccine efficacy trials: analysis by severity of diarrhea.** *Pediatr. Infect. Dis. J.*, Nov. 1999, v.18, n.11, p.1001-1006.

LINHARES, A. C. *et al.* **Neonatal rotavirus infection in Belem, northern Brazil: nosocomial transmission of a P[6] G2 strain.** *J. Méd. Virol.*, Jul. 2002, v.67, n.3, p.418-426.

LINHARES, A. C. *et al.* **Gastroenterites por rotavírus.** In: *Tratado de Infectologia*. Editado por VERONESI, R. e FOCACCIA, R., São Paulo: Atheneu, 2005, p.441-453.

LINHARES, A. C. *et al.* **A short report on highlights of world-wide development of RIX4414: a Latin American experience.** *Vaccine*, 2006, p.3784-3785.

LOPEZ, S. e ARIAS, C. F. **Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance.** *Trends Microbiol.*, Jun. 2004, v.12, n.6, p.271-278.

LOPEZ, S. e ARIAS, C. F. **Early steps in rotavirus cell entry.** *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2006, v.309, p.39-66.

LUNDGREN, O. *et al.* **Role of enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea.** *Science*, Jan. 2000, v.287, n.5452, p.491-495.

LUZ, C. R. N. E. *et al.* **Rotavirus serotypes and electropherotypes identified among hospitalised children in São Luís, Maranhão, Brazil.** *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, Set./Out. 2005, vol.47, n.5, p.287-293.

MARTELLA, V. *et al.* **Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain.** *Virology*, Mar. 2006, v.346, n.2, p.301-311.

MASCARENHAS, J. D. P. e LINHARES, A. C. **Rotavirus gastroenteritis and the urgent need for a vaccine in developing countries.** *Postgraduate Doctor Caribbean*, 2005, v.21, n.5, p.152-161.

MASCARENHAS, J. D. P. *et al.* **Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belem, Brazil.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Jan. 2002, v.97, n.1, p.113-117.

MASCARENHAS, J. D. P. *et al.* **Molecular analysis of VP4, VP7, and NSP4 genes of P[6]G2 rotavirus genotype strains recovered from neonates admitted to hospital in Belem, Brazil.** *J. Med. Virol.*, Fev. 2006, v.78, n.2, p.281-289.

MOLBAK, K.; FISCHER, T. K. e MIKKELSEN, C. S. **The estimation of mortality due to rotavirus infections in sub-Saharan Africa.** *Vaccine*, Out. 2000, v.19, n.4-5, p.393-395.

MOTA-HERNANDEZ, F. *et al.* **Rotavirus diarrhea severity is related to the VP4 type in Mexican children.** *J Clin. Microbiol.*, Jul. 2003, v.41, n.7, p.3158-3162.

NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T. e ARISAWA, K. **A lack of significant association between the electropherotype or G-serotype of the infecting strain and disease severity of rotavirus gastroenteritis.** *Arch. Virol.*, Out. 2006, v.151, n.10, p.1947-1960.

OFFIT, P. A. *et al.* **Rotavirus-specific helper T cell responses in newborns, infants, children, and adults.** *J. Infect. Dis.*, Jun. 1992, v.165, n.6, p.1107-1111.

OLIVEIRA, C. S. e LINHARES, A. C. **Rotavirus: clinical features and prevention.** *J. Pediatr.*, Jul. 1999, v.75, Supl.1, p.S91-S102.

O'RYAN, M. *et al.* **Rotavirus-associated medical visits and hospitalizations in South America: a prospective study at three large sentinel hospitals.** *Pediatr. Infect. Dis. J.*, Jul. 2001, v.20, n.7, p.685-693.

PARASHAR, U. D. *et al.* **Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children.** *Emerg. Infect. Dis.*, Maio 2003, v.9, n.5, p.565-572.

PARASHAR, U. D. *et al.* **Rotavirus and severe childhood diarrhea.** *Emerg Infect Dis.*, Fev. 2006, v.12, n.2, p.304-306.

PARRA, G. I. *et al.* **Molecular characterization and genetic variation of the VP7 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay.** *J. Med. Virol.*, Dez. 2005 v.77, n.4, p.579-586.

PEREIRA, H. G. *et al.* **Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Out./Dez. 1983, v.78, n.4, p.483-490.

RAO, C. D.; GOWDA, K. e REDDY, B. S. **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* , Out. 2000, v.276, n.1, p.104–113.

RAMIG, R. F. **Genetics of the rotaviruses.** *Annu. Rev. Microbiol.*, 1997, v.51, p.225-55.

ROLLO, E. E. *et al.* **The epithelial cell response to rotavirus infection.** *J. Immunol.*, Out.1999, v.163, p.4442-4452.

RUIZ-PALACIOS, G. M. *et al.* **Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis.** *N. Engl. J. Med.*, Jan. 2006, v.354, n.1, p.11-22.

SAIF, L. J. e JIANG, B. **Non-group A rotaviruses of humans and animals.** *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1994, v.85, p.339-371.

SALINAS, B. *et al.* **Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy of an attenuated rotavirus vaccine, RIX4414: A randomized, placebo-controlled trial in Latin American infants.** *Pediatr. Infect. Dis. J.*, Set. 2005, v.24, n.9, p.807-816.

SANEKATA, T. *et al.* **Human Group B Rotavirus Infections Cause Severe Diarrhea in Children and Adults in Bangladesh.** *J. Clin. Microbiol.*, Maio 2003, v.41, n.5, p.2187–2190.

SANTOS, N. e HOSHINO, Y. **Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine.** *Rev. Med. Virol.*, Jan./Fev. 2005 v.15, n.1, p.29-56.

SANTOS, N. *et al.* **Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment.** *J. Clin. Microbiol.*, Ago. 1999, v.37, n.8, p.2734-2736.

SANTOS, N. *et al.* **Surveillance of rotavirus strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999.** *J. Clin. Microbiol.*, Jul. 2003, v.41, n.7 , p.3399-3402.

SANTOS, N. *et al.* **Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies.** *J. Clin. Microbiol.*, Ago. 2005, v. 43, n.8, p. 4064-4069.

SATTAR, S.A. *et al.* **Interruption of rotavirus spread through chemical disinfection.** *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, Dez. 1994, v.15, n.12, p.751-756.

SOUZA, M. B. *et al.* **Molecular and serological characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Goiânia, Brazil, 1998-2000.** *Europ. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, Jul. 2003, v.22, n.7, p.441-443.

STEELE, A. D. e IVANOFF, B. **Rotavirus strains circulating in Africa during 1996-1999: emergence of G9 strains and P[6] strains.** *Vaccine*, Jan. 2003 Jan , v.21, n.5-6, p.361-367.

TANIGUCHI, K. e URASAWA, S. **Diversity in rotavirus genomes.** *Seminars in Virology*, 1995, v.6, p 123-131.

TIMENETSKY, M. C. *et al.* **A novel human rotavirus serotype with dual G5-G11 specificity.** *J. Gen. Virol.*, Jun. 1997, v.78, p.1373-1378.

VESIKARI, T. *et al.* **Effects of the potency and composition of the multivalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine on efficacy, safety and immunogenicity in healthy infants.** *Vaccine*, Mai. 2006, v.24, n.22, p. 4821-4829.

VOLOTÃO, E. M. *et al.* **Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro-Brazil during 2000-2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities.** *J. Med. Virol.*, Fev. 2006, v.78, n.2, p.263-272.

WARD, R. L. *et al.* **Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection.** *J. Infect. Dis.*, Nov. 1986, v.154, n.5, p.871-880.

ZHENG, B.J. *et al.* **Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children.** *J. Med. Virol.*, Maio 1991, v.34, n.1, p.29-37.

## **ANEXOS**

## Anexo 1

### ESTUDOS DE GASTROENTERITES VIRAIS Instituto Evandro Chagas 1982 a 2003

#### Estudo Longitudinal

TIPO DE ESTUDO: longitudinal  
OBJETIVO: epidemiologia e os aspectos clínicos da infecção por rotavírus  
PERÍODO: dezembro/82 a março/86  
PACIENTES: 80 crianças que foram acompanhadas desde o nascimento até os três anos de idade  
MÉTODOS USADOS P/ RVs: EIE, EGPA  
Nº ESPÉCIMES ANALISADOS: 9

#### Estudo com a vacina RRV-TV

TIPO DE ESTUDO: prospectivo, duplo-cego, randomizado e controlado com placebo  
OBJETIVO: avaliar inocuidade, imunogenicidade e eficácia da vacina tetravalente rearranjada RRV-TV em crianças saudáveis em Belém, Brasil  
PERÍODO: junho/90 a junho/92.  
PACIENTES: 540 crianças que receberam a RRV-TV ou placebo aos 1º, 3º e 5º meses de idade  
MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE RVs: EIE, EGPA, sorotipagem com Mabs  
Nº ESPÉCIMES ANALISADOS: 44

#### Estudo Nosocomial

TIPO DE ESTUDO: transversal  
OBJETIVO: determinar o papel dos rotavírus como causa de diarreia nosocomial  
PERÍODO: novembro/92 a maio/94  
PACIENTES: 290 crianças na faixa etária de 0 a 5 anos, internadas na Santa Casa de Misericórdia do Pará  
MÉTODOS USADOS P/ RVs: EIE, EGPA, sorotipagem com Mabs  
Nº ESPÉCIMES ANALISADOS: 14

#### Estudo Hospital-Sentinel

TIPO DE ESTUDO: transversal  
OBJETIVO: medir a diversidade antigênica das cepas circulantes de rotavírus e o impacto da doença causada por esses agentes em Belém, Pará  
PERÍODO: maio/98 a maio/00  
PACIENTES: 834 crianças, de 0 a 3 anos, atendidas a nível ambulatorial ou hospitalar  
MÉTODOS USADOS P/ RVs: EIE, EGPA, sorotipagem com Mabs, RT-PCR  
Nº ESPÉCIMES ANALISADOS: 31

#### Vigilância Epidemiológica

TIPO DE ESTUDO: transversal  
OBJETIVO: estimar o impacto da doença e a epidemiologia dos rotavírus em uma população de crianças menores de três anos  
PERÍODO: março a outubro/03  
PACIENTES: 762 crianças, com 0 a 3 anos internadas em hospitais de Belém  
MÉTODOS USADOS P/ RVs: EIE, EGPA, sorotipagem com Mabs, RT-PCR  
Nº ESPÉCIMES ANALISADOS: 50

## Anexo 2 – Preparo das soluções

a) Tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M, pH 9,6

Carbonato de sódio (Sigma)	1,36 g
Bicarbonato de sódio (Merck)	7,35 g
Água destilada quantidade suficiente para (q.s.p)	1000 mL

Dissolver os reagentes em 800 mL de água e completar o volume para 1000 mL. Ajustar para pH 9,6 com hidróxido de sódio 1 M ou ácido clorídrico 1 M, se necessário. Filtrar e estocar a 4°C.

b) Tampão PBS 25X

Fosfato de sódio dibásico (Vetec)	27,0 g
Fosfato de sódio monobásico (Merck)	7,875 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

c) PBS 10 mM, pH 7,5

PBS 25X	40 mL
Cloreto de sódio (Vetec)	8,5 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

Ajustar, com hidróxido de sódio 1 M a pH 7,5 e armazenar a 4,0°C.

d) Tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0

Ácido cítrico 0,1 M	24,3 mL
Fosfato de sódio dibásico 0,2 M	25,7 mL
Água destilada q.s.p.	50 mL

O ácido cítrico e o fosfato de sódio dibásico são preparados minutos antes manipular o tampão que deverá ser armazenado a 4,0°C.

e) Tampão Tris-Ca<sup>++</sup> 0.01M, pH 7,2

Tris Base (GIBCO-BRL)	1,21 g
Cloreto de cálcio (Vetec)	0,22 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

Adicionar cloreto de cálcio e tris base em 200 mL de água destilada. Homogeneizar e completar com água até o volume final. Armazenar em recipientes transparentes e estocar a temperatura ambiente (TA).

f) Sílica

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

Homogeneizar a sílica e deixar sedimentar por 24 h. Aspirar por sucção 430 mL e desprezar o sobrenadante. Completar o volume para 500 mL com água destilada, homogeneizar, sedimentando-se naturalmente por 5 h. Aspirar, por sucção, 440 mL do sobrenadante e desprezá-lo. Ajustar o sedimento para pH 2,0 pela adição de 600 µL de ácido clorídrico 37% (Merck). Aliquotar 10 mL da solução em frascos de cor âmbar, autoclavar e estocar a TA.

g) Tampão L2

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

Homogeneizar o isotiocianato de guanidina juntamente com tris-HCl 0,1M, pH 6,4, até dissolver totalmente o soluto. Armazenar em frascos de cor âmbar e estocar a TA.

h) Tampão L6

Isotiocianato de guanidina (Sigma)	120 g
Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4 (GIBCO-BRL)	100 mL
Triton X-100 (Pharmacia Biotech)	1,3 g
EDTA 0,2 M, pH 8,0 (Pharmacia Biotech)	22 mL

Em um recipiente de vidro colocar EDTA 0,2 M, pH 8,0, juntamente com Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4. Adicionar o isotiocianato de guanidina e homogeneizar o até total dissolução. Por último, acrescentar triton X-100 lentamente. Armazenar em frascos de cor âmbar e estocar a TA

i) Tampão tris glicina

Tris-base	24,0 g
Glicina	115,3 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

j) Persulfato de amônio 10%

Persulfato de amônio (GIBCO-BRL)	1 g
Água milli-Q q.s.p	10 mL

Em 10 mL de água destilada, adicionar persulfato de amônio. Homogeneizar, armazenar em recipiente transparente e estocar a 4°C.

l) Acrilamida/bisacrilamida 30:0,8

N'N'-metileno-bisacrilamida (Sigma)	0,8 g
Acrilamida (Sigma)	30 g
Água milli-Q q.s.p	100 mL

Adicionar acrilamida a 50 mL de água destilada e homogeneizar. Acrescentar N'N'-metileno-bisacrilamida e dissolvê-lo. Completar com água até o volume final e filtrar. Armazenar em recipiente transparente e estocar a 4°C.

m) Tris Base 2M

Tris-base (GIBCO-BRL)	24,2 g
Água milli-Q q.s.p	100 mL

Adicionar a 50 mL de água destilada 24,2 g de tris-base e homogeneizar. Completar com água até o volume final. Ajustar para pH 8,8 com HCl 1M e filtrar. Armazenar em recipientes transparentes e estocar a 4°C.

n) Gel de poliacrilamida 5%

Acrilamida/bisacrilamida 30:0,8	1,66 mL
Tris-base 2 M, pH 8,8	1,87 mL
TEMED	6 µL
Persulfato de amônio 10%	150 µL
Água destilada	6,28 mL

Colocar acrilamida/bisacrilamida 30:0,8, tris-base 2 M, pH 8,8 e água destilada em um recipiente de vidro. Adicionar TEMED e persulfato de amônio 10% para catalisarem a reação. Acrescentar a solução entre as placas de vidro onde irá ser preparado o gel de poliacrilamida e esperar solidificar a TA.

o) Hidróxido de sódio 10M

Hidróxido de sódio (Vetec)	40 g
Água destilada q.s.p	100 mL

Armazenar em recipiente de plástico a TA.

p) Solução de nitrato de prata 100X

Nitrato de prata (Sigma)	5,5g
Água destilada q.s.p	30 mL

Armazenar em recipiente de vidro âmbar a 4,0 °C.

q) Azul de bromofenol

Azul de bromofenol (Invitrogen)	0,25%
Glicerol (Invitrogen)	20%
Água milli-Q q.s.p	100 mL

r) Solução para coloração

Solução de nitrato de prata 100X	1 mL
Água destilada q.s.p	100 mL

s) Solução para fixação

Etanol PA (Merck)	10 mL
Ácido acético PA (Reagen)	0,5 mL
Água destilada q.s.p	100 mL

t) Solução para revelação

Hidróxido de sódio 10M	7,5 mL
Formaldeído 37% (Merck)	0,8 mL
Água destilada q.s.p	100 mL

u) Gel de agarose 1,5%

Agarose (GIBCO-BRL)	1,5 g
Tampão TBE 1X q.s.p	100 mL

v) Tampão TBE 10X

Tris-base (GIBCO-BRL)	108 g
Ácido bórico (Reagen Quim. Ind. Quim. S.A.)	55 g
EDTA 0,5 M, pH 8,0 (Pharmacia Biotech)	40 mL

Diluir para uso essa solução 1X antes do uso.