



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM
PATOLOGIA TROPICAL



OCORRÊNCIA DE GENÓTIPOS COM CARACTERÍSTICAS
DE ROTAVÍRUS HUMANO EM AMOSTRAS DE FEZES
DIARRÉICAS DE CRIANÇAS ATENDIDAS EM PRONTOS
SOCORROS INFANTÍIS DO MUNICÍPIO DE MANAUS – AM

GIANE ZUPELLARI DOS SANTOS

MANAUS
2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM
PATOLOGIA TROPICAL**

GIANE ZUPELLARI DOS SANTOS

**OCORRÊNCIA DE GENÓTIPOS COM CARACTERÍSTICAS
DE ROTAVÍRUS HUMANO EM AMOSTRAS DE FEZES
DIARRÉICAS DE CRIANÇAS ATENDIDAS EM PRONTOS
SOCORROS INFANTÍIS DO MUNICÍPIO DE MANAUS – AM**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de mestre em Patologia Tropical na área de concentração de diagnóstico e controle.

Orientador – Dr. Cristóvão Alves da Costa

**MANAUS
2008**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Santos, Giane Zupellari dos

S237o Ocorrência de genótipos com características de rotavírus humano em amostras de fezes diarréicas de crianças atendidas em prontos socorros infantis do município de Manaus – AM / Giane Zupellari dos Santos. - Manaus: UFAM, 2008.
109 f.

Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) —
Universidade Federal do Amazonas, 2008.

Orientador: Prof. Dr. Cristóvão Alves da Costa

1. Diagnóstico microbiológico 2. Amostra de Fezes - VP7
- VP43 Rotavírus – Crianças 4. Gastroenterite I. Costa,
Cristóvão Alves da II. Universidade Federal do Amazonas III.
Título

CDU 616-022.6(811.3) (043.3)

*O segredo é não correr atrás das borboletas...
É cuidar do jardim para que elas venham até você.*

Robin Williams

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM
PATOLOGIA TROPICAL**

**OCORRÊNCIA DE GENÓTIPOS COM CARACTERÍSTICAS
DE ROTAVÍRUS HUMANO EM AMOSTRAS DE FEZES
DIARRÉICAS DE CRIANÇAS ATENDIDAS EM PRONTOS
SOCORROS INFANTIS DO MUNICÍPIO DE MANAUS – AM**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de mestre em Patologia Tropical na área de concentração de diagnóstico e controle.

Avaliação em 01 de agosto de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Cristóvão Alves da Costa, Presidente
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof^o. Dr. David Lopes Neto, Membro Interno
Universidade Federal do Amazonas

Prof^o. Dr. José Camilo Hurtado Guerreiro, Membro Externo
Fundação Oswaldo Cruz-Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane-Manaus

DEDICATÓRIA

A minha família:

*Meus pais José e Doralice,
que de forma amorosa foram a
base sólida da minha formação;*

*Meus irmãos GG e Genoveva,
que estiveram ao meu lado em todos
os momentos da minha Vida de forma
carinhosa e protetora;*

*Meu companheiro, Nio
que preenche a minha vida com
alegrias, amor e companheirismo.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, Dr. Cristóvão Alves da Costa, pela paciência e dedicação com que me repassou seus conhecimentos durante todo o período do desenvolvimento desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Companheiro, Roberlânio de Oliveira Melo, pelo auxílio no levantamento de dados bibliográficos, na tabulação de dados e estruturação dessa dissertação;

Aos técnicos e estagiários do laboratório de virologia do INPA pela realização das análises de EGPA;

À farmacêutica Ilia Gilmaria Carvalho dos Santos pela realização das análises de RT-PCR;

Ao Estatístico Edson da Fonseca de Lira pelo auxílio na análise estatística dos dados;

À Diretoria de Ensino e Pesquisa, Núcleo de Epidemiologia do HEMOAM por disponibilizar o servidor Edson da Fonseca de Lira para análise estatística dos dados;

À secretaria estadual de saúde do Estado do Amazonas por permitir que a coleta do material necessária para o desenvolvimento deste estudo fosse realizada nas instituições infantis pela quais é responsável;

Aos diretores dos Hospitais e Prontos Socorros da Criança da Zona Leste, Zona Oeste e Zona Sul por permitirem que fosse realizada a coleta de material nestas instituições;

Ao ICAM (Instituto da Criança do Amazonas) por permitir que fosse realizada a coleta de material nesta instituição;

Ao Laboratório Reunidas por permitir que as amostras fecais permanecessem armazenadas em suas dependências até o momento de envio para o INPA;

Aos técnicos laboratoriais do Laboratório Reunidas por estarem sempre atentos e nos avisarem do atendimento a crianças que poderiam ser incluídas no estudo;

Aos enfermeiros dos HPCS Zona Leste, Zona Oeste e Zona Sul por estarem sempre atentos e nos avisarem do atendimento a crianças que poderiam ser incluídas no estudo;

Aos Enfermeiros da Central de Material Esterilizado do Hospital e Pronto Socorro Dr. João Lúcio Pereira Machado, pelo auxílio no preparo e esterilização de frascos para as coletas;

Aos companheiros de trabalho Tezeu Machado e Marilu Barbieri pela compreensão e apoio;

À amiga Raquel Assunção Benfica Mota pelo auxílio fundamental na coleta de amostras fecais e de dados;

Ao Amigo José Neto Ribeiro pelo auxílio na coleta de amostras fecais e de dados;

À amiga Denise Colosso Rangel pelo apoio e pelo auxílio na coleta de amostras fecais;

RESUMO

Os rotavírus humano constituem uma das mais importantes causas de doença diarreica em crianças menores de cinco anos em todo o mundo. Com o objetivo de verificar a ocorrência de genótipos de rotavírus humano em crianças de 1 a 36 meses residentes no município de Manaus no Amazonas, foram analisadas durante os anos de 2004 a 2006, um total de 607 amostras de fezes diarreicas que foram coletadas de crianças atendidas em prontos socorros infantis do município de Manaus. Esta análise foi realizada pela detecção do genoma viral através das técnicas de EGPA (eletroforese em gel de poliacrilamida) e RT-PCR (reação de polimerase em cadeia com transcriptase reversa). Através do método de EGPA pode-se observar uma positividade de 25% das amostras para rotavírus humano. Todas as amostras positivas para rotavírus foram genotipadas pelo método de RT-PCR com utilização de primers específicos para os genótipos G (G1, G2, G3, G4 e G9) e genótipos P (P[8], P[4], P[6], P[9] e P[10]). Pela genotipagem foi detectado o genótipo G em 30,7% das amostras positivas para rotavírus, com predominância dos genótipos G2 (17%), seguidos de G1 (14,9%) e G9 (10,6%) e o genótipo P em 44,7% das amostras positivas para os rotavírus, com predominância dos genótipos P[8] em 66,2% das amostras e P[4] em 13,2% das amostras. As combinações dos genótipos G e P foram responsáveis por 53,3% das amostras positivas para rotavírus, sendo que P[8]G1 e P[4]G2 foram as mais encontradas com 12,5% e 10% consecutivamente, seguidas de P[8]G3 (5%). Outras combinações como P[4]G1, P[8]G9 e P[10]G1 também foram encontradas em números menos expressivos. Foi observado que 38,3% das amostras positivas para o genótipo G e 11,7% das amostras positivas para o genótipo P não apresentaram características para nenhum dos genótipos G e P pesquisados. O número amostras positivas para rotavírus humano, bem como para os genótipos G e para os genótipos P foram semelhantes tanto em crianças do sexo masculino, quanto em crianças do sexo feminino, sendo que estas amostras predominaram em crianças menores de 18 meses. As amostras positivas para rotavírus humano, assim como para os genótipos G e para o genótipo P foram encontradas em todos os meses do estudo. A zona leste da cidade de Manaus foi onde foram encontradas o maior número de amostras positivas para rotavírus, assim como para o genótipo G e para o genótipo P. As crianças com amostras positivas para rotavírus apresentaram em média de 10 episódios de diarreia por criança por dia com predominância para os fezes de aspecto líquido (86,2%). Este perfil também foi observado nas crianças com amostras positivas para os genótipos G e para os genótipos P. Com exceção da hipertermia, outros sinais e sintomas característicos da doença diarreica por rotavírus como vômito, desidratação e dor abdominal, estiveram presentes na maior parcela das crianças com amostras positivas para os rotavírus humano, para o genótipo G e para o genótipo P. O número elevado de amostras que não foram tipadas com utilização de primers específicos para os genótipos G e P sugerem a circulação de genótipos incomuns na região, porém para que esta situação seja definida, novos estudos da epidemiologia molecular dos rotavírus circulantes em Manaus, Amazonas, devem ser desenvolvidos, incluindo inclusive primers específicos para detecção de rotavírus de origem animal.

Palavras-Chaves: Genótipos, Rotavírus, Amostras de Fezes

ABSTRACT

Human rotavirus constitutes one of the most important causes of diarrheic disease in children less than five years in the whole world. With the objective of verifying the occurrence of genotypes of human rotavirus in children of 1 to 36 months residents in the city of Manaus in Amazon, had been analyzed during the years from 2004 to 2006, a total of 607 the feces diarrheic samples that had been collected of children attended hospital of children in the city of Manaus. This analyzes was carried through by the detection of the viral genome through the techniques of EGPA (electrophoresis in gel of polyacrylamide), and RT-PCR (reaction in chain of polymerases associated to the reaction of reversal transcriptase). Through the EGPA method can be observed a positivity of 25% of the human rotavirus samples. All of the positive samples for rotavirus had been genotyped by the method of RT-PCR with use of specific primers for genotypes G (G1, G2, G3, G4 and G9) and genotypes P (P[8], P[4], P[6], P[9] and P[10]). By the genotyping, it was detected genotype G in 30,7% of the positive samples for rotavirus, with predominance of the G2 genotypes (17%), followed of G1 (14.9%) and G9 (10.6%) and genotype P in 44,7% of the positive samples for rotavirus, with predominance of genotypes P[8] in 66,2% of samples and P[4] in 13,2% of the samples. The combinations of genotypes G and P had been responsible for 53,3% of the positive samples for rotavirus, being that P[8]G1 and P[4]G2 had been found with 12,5% and 10% consecutively, followed of P[8]G3 (5%). Other combinations as P[4]G1, P[8]G9 and P[10]G1 had been also found in less expressive numbers. It was observed that 38.3% of the positive samples for genotype G and 11.7% of the positive samples for genotype P had not presented characteristics for none of searched genotypes G and P. The number positive samples for human rotavirus, as well as for genotypes G and genotypes P had been similar in such a way in children of the masculine sex, how much in children of the feminine sex, being that these samples had predominated in children less than 18 months. The positive samples for human rotavirus, as well as for genotypes G and genotype P had been found in every month of the years of had lasted the study. The east zone of the city of Manaus was where they had been found the biggest number of positive samples for rotavirus, as well as for genotype G and genotype P. The children with positive samples for rotavirus had presented on average of 10 episodes of diarrhea for child per day with predominance for the feces of liquid aspect (86.2%), this profile also was observed in the children with positive samples for genotypes G and genotypes P. With exception of the hyperthermia, other signals and characteristic symptoms of the diarrheic disease for rotavirus as vomit, dehydration and abdominal pain, had been presents in the biggest parcel of the children with positive samples in such a way for human rotavirus as for genotype G, as for genotype P. The high number of samples that had not been “tipadas” with use of specific primers for genotypes G and P, suggest the circulation of uncommon genotypes in the region, however so that this situation is defined, new studies of the epidemiological molecular of rotavirus circulating in Manaus, Amazon, must be developed, enclosed specific primers also for detection of rotavirus of animal origin.

Key-words: Genotypes, Rotavirus, Samples of feces

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E GRÁFICOS

Figura 1	Estrutura de rotavírus. Seqüência dos 11 segmentos de RNA em EGPA e diagrama esquemático de rotavírus.....	21
Figura 2	Distribuição global de óbitos causados por rotavírus.....	23
Figura 3	Cadeia de transmissão predominante na rotavirose.....	26
Figura 4	Fisiopatologia da doença diarréica por rotavírus.....	28
Gráfico 1	Positividade para rotavírus humano em amostras de fezes diarréica coletadas de crianças de 1 a 36 meses em Manaus, AM de julho de 2004 a dezembro de 2006.....	50
Gráfico 2	Positividade para rotavírus humano conforme o sexo de crianças de 0 a 36 meses em amostras de fezes diarréicas coletadas em Manaus, AM.....	51
Gráfico 3	Distribuição do número de amostras positivas e negativas para rotavírus humano em amostras de fezes diarréicas coletadas em Manaus, AM de crianças de 1 a 36 meses.....	52
Gráfico 4	Porcentagem de amostras positivas para rotavírus humano em crianças de 1 a 36 meses divididas por faixa etária em Manaus, AM.....	53
Gráfico 5	Amostras de fezes positivas para rotavírus humano distribuídas conforme o mês de ocorrência no período de junho de 2004 a dezembro de 2006 em Manaus, AM.....	54
Gráfico 6	Número de episódios de diarréia apresentados por crianças com amostras positivas rotavírus humano em Manaus, AM.....	57
Gráfico 7	Aspecto das fezes de crianças com amostras positivas e negativas para rotavírus humano em Manaus, AM.....	57
Gráfico 8	Presença de sinais e sintomas característicos da doença diarréica em crianças com amostras de fezes positivas para rotavírus humano em Manaus, AM.....	59
Gráfico 9	Distribuição da existência de animais domésticos em residências de crianças com amostras positivas e negativas para rotavírus humano em Manaus, AM.....	60
Gráfico 10	Distribuição da positividade para os genótipos P e G e das combinações P e G em amostras de fezes positivas para rotavírus humano de crianças de 01 a 36 meses em Manaus, AM.....	63
Gráfico 11	Distribuição do número e proporções de amostras de fezes positivas para o genótipo G em Manaus, AM.....	65
Gráfico 12	Distribuição do número e proporções de amostras de fezes positivas para o genótipo G em Manaus, AM.....	66

Gráfico 13	Número de amostras de fezes positivas para o genótipo G conforme o sexo de crianças de 1 a 36 meses em Manaus, AM.....	73
Gráfico 14	Número de amostras positivas para o genótipo G em crianças de 1 a 36 meses distribuídas por faixa etária em Manaus, AM.....	74
Gráfico 15	Distribuição da presença de vômito em crianças com amostras positivas para o genótipo G em Manaus, AM.....	81
Gráfico 16	Distribuição da presença de desidratação em crianças com amostras positivas para o genótipo G em Manaus, AM.....	81
Gráfico 17	Distribuição da presença de dores abdominais em crianças com amostras positivas para o genótipo G em Manaus, AM.....	82
Gráfico 18	Distribuição da presença de hipertermia em crianças com amostras positivas para o genótipo G em Manaus, AM.....	82
Gráfico 19	Número de amostras de fezes positivas para o genótipo P conforme o sexo de crianças de 1 a 36 meses em Manaus, AM.....	85
Gráfico 20	Número de amostras positivas para o genótipo P em crianças de 1 a 36 meses distribuídas por faixa etária em Manaus, AM.....	87
Gráfico 21	Distribuição da presença de vômito em crianças com amostras positivas para o genótipo P em Manaus, AM.....	92
Gráfico 22	Distribuição da presença de desidratação em crianças com amostras positivas para o genótipo G em Manaus, AM.....	93
Gráfico 23	Distribuição da presença de dores abdominais em crianças com amostras de fezes positivas para o genótipo P em Manaus, AM e suas respectivas proporções.....	94
Gráfico 24	Distribuição da presença de hipertermia em crianças com amostras de fezes positivas para o genótipo P em Manaus, AM e suas respectivas proporções.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Esquema de tratamento da doença diarréica por rotavírus.....	32
Tabela 2	“Pool de Primers” para definição dos genótipos P.....	48
Tabela 3	“Pool de Primers” para definição dos genótipos G.....	48
Tabela 4	Distribuição do número e porcentagem de amostras positivas e negativas para rotavírus humano por zona de Manaus, AM.....	55
Tabela 5	Positividade e negatividade para os genótipos P e G em amostras de fezes diarréicas de crianças e 1 a 36 meses, em Manaus, AM.....	62
Tabela 6	Combinações entre os genótipos G e P em amostras de fezes positivas para rotavírus humano em Manaus, AM.....	71
Tabela 7	Combinações de Genótipos P e G em amostras de fezes coletadas de julho de 2004 a dezembro de 2006, em Manaus, AM.....	72
Tabela 8	Amostras positivas para o genótipo G em crianças de 1 a 36 meses, distribuídas pela faixa etária em Manaus, AM.....	75
Tabela 9	Distribuição da ocorrência de Genótipos G por mês de ocorrência em amostras de fezes coletas em Manaus, AM, de Julho de 2004 a dezembro de 2006.....	76
Tabela 10	Amostras positivas para o genótipo G distribuídas pelas Zonas da cidade de Manaus, AM.....	77
Tabela 11	Distribuição da quantidade de episódios de diarréia apresentados por crianças com amostras positivas para o genótipo G em Manaus, AM.....	79
Tabela 12	Aspecto da amostra de fezes diarréicas positivas para o genótipo G apresentadas por crianças de Manaus, AM.....	79
Tabela 13	Presença de animais domésticos em residências de crianças com amostras de fezes positivas para o genótipo G.....	83
Tabela 14	Presença de animais domésticos divididos por espécies em residências de crianças com amostras de fezes positivas para o genótipo G.....	84
Tabela 15	Número de amostras positivas para o genótipo G em crianças de 01 a 36 meses, distribuídas por faixa etária em Manaus, AM.....	87
Tabela 16	Distribuição da ocorrência de Genótipos P por mês em amostras de fezes coletas em Manaus, AM, de julho de 2004 a dezembro de 2006.....	88
Tabela 17	Amostras positivas para o genótipo P distribuídas pelas zonas da cidade de Manaus, AM.....	89
Tabela 18	Distribuição da quantidade de episódios de diarréia apresentados por crianças com amostras positivas para o genótipo P em Manaus, AM.....	90

Tabela 19	Aspecto da amostra de fezes diarréicas positivas para o genótipo P apresentadas por crianças de Manaus, AM.....	91
Tabela 20	Presença de animais domésticos em residências de crianças com amostras de fezes positivas para o genótipo P.....	96
Tabela 21	Presença de animais domésticos divididos por espécies em residências de crianças com amostras de fezes positivas para o genótipo P.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APL	Aglutinação em Partículas de Látex
bp	Pares de Base
°C	Graus Centígrados
Ca⁺⁺	Cálcio
cADN	ADN complementário
CDC	Centers for Diseases Control and Prevention
CEP-INPA	Comitê de Ética em Pesquisa - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
CGDT	Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis
COVEH	Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
dATP,	Deoxidenosine triphosphate
dCTP	Deoxicytidine triphosphate
DDTHA	Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar
DEVEP	Departamento de Vigilância Epidemiológica
dGTP	Deoxiguanosine triphosphate
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNase	Desoxyribonuclease
dsRNA	Double Straind Ribonucleic Acid
dTTP	Deoxithymidine triphosphate
EDTA	Ácido Tetracético Etilenodiano
EGPA	Eletroforese de RNA em Gel de Poliacrilamida.
ELISA	Enzyme-Linked-immunosorbent Assay.
FAPEAM	Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Força Gravitacional
HCl	Ácido Clorídrico
HEMOAN	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HPSC	Hospital e Pronto Socorro da Criança.
ICAM	Instituto de Saúde da Criança do Amazonas

IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
KCl	Cloreto de Potássio
M	Molar
mA	Mili Ampère
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
MMDA	Monitorização das Doenças Diarréicas agudas
mM	Milímetro
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de sódio.
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanometro
NPS	Not Structural Protein
pH	Potencial Hidrogeniônico
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PNI	Programa Nacional de Imunização
RNA	Ácido Ribonucléico.
RNase	Ribonuclease
RT-PCR	Transcriptase Reversa – Reação de Polimerase em Cadeia
RRV-TV	Rhesus-human Reassortant rotavirusTetravalent Vaccine
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SES	Secretaria Estadual de Saúde
SP	São Paulo
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TEMED	tetrametilenodiamina
TRIS	Hidroximetil-aminometano
µL	Microlitro
USA	United States of American
V	Volt
VP	Viral Protein

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. A Doença diarréica por rotavírus.....	18
1.2. Histórico.....	19
1.3. Características morfológicas do rotavírus.....	20
1.4. Epidemiologia.....	23
1.5. Patogênese.....	26
1.6. Manifestações clínicas.....	29
1.7. Diagnóstico clínico laboratorial.....	30
1.8. Tratamento.....	32
1.9. Imunidade.....	33
1.10. Vacina contra rotavírus.....	34
1.11. Prevenção e controle.....	36
2. OBJETIVOS	38
2.1 Geral.....	38
2.2 Específico.....	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. Modelo de estudo.....	39
3.2 Universo de estudo.....	39
3.2.1 Participantes.....	39
3.3 Coleta de amostras fecais.....	40
3.4 Método laboratorial.....	41
3.4.1 Detecção de rotavírus pela eletroforese em gel de poliacrilamida do genoma viral (dsRNA-EGPA).....	41
3.4.1.1 Extração do genoma viral.....	41
3.4.1.2 Preparo do gel de poliacrilamida.....	42
3.4.1.3 Coloração do gel com nitrato de prata.....	43
3.4.1.4 Secagem do gel.....	44
3.4.1.5 Fotografia do gel.....	44
3.4.2 Caracterização molecular das amostras de rotavírus em genótipos P (VP4) e G (VP7) por meio de reação de polimerase em cadeia (PCR).....	44

3.4.2.1 Extração do ácido ribonucléico (RNA) viral para a reação de transcriptase reversa seguida de reação de polimerase em cadeia (RT-PCR).....	45
3.4.2.2 Transcriptase reversa seguida de reação de polimerase em cadeia (RT-PCR).....	46
3.4.2.3 Reação de PCR para genotipagem viral.....	46
3.4.2.4 Iniciadores (Primers) utilizados.....	47
3.4.2.5 Análise do perfil genômico viral por eletroforese em gel de agarose.....	48
3.5 Análise estatística.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1 Positividade para rotavírus.....	50
4.2 Positividade para os genótipos P e G de rotavírus Humano.....	61
4.2.1 Características das amostras positivas para o genótipo G de rotavírus humanos.....	71
4.2.2 Características das amostras positivas para o genótipo P de rotavírus humanos.....	85
5. CONCLUSÃO.....	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Doença diarréica por rotavírus

A doença diarréica é considerada uma das doenças mais comuns em crianças em todo o mundo. Embora as evidências demonstrem o declínio da mortalidade nessa última década, em algumas áreas subdesenvolvidas a diarréia permanece como uma das principais causas de morte em crianças menores de dois anos de idade. Em países em desenvolvimento, como o Brasil, a importância das doenças diarréicas está relacionada ainda ao impacto produzido na população, traduzido pelos danos à saúde, que afetam diretamente o desenvolvimento infantil, bem como à sociedade pelos custos diretos gerados pela demanda aos serviços médicos, atendimento ambulatorial, prontos atendimentos e hospitalizações e com custos indiretos, como perdas de dias de trabalho, de escola, gastos com medicamentos, transportes, entre outros (VRANJAC, 2004).

Estima-se que no mundo, anualmente, 1,3 bilhões de episódios de diarréia possam acometer crianças menores de cinco anos de idade, sendo responsáveis por quatro milhões de mortes (BRASIL, 2005).

Dados do sistema de MDDA/MS (Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas/Ministério da Saúde) mostram que, durante o ano de 2004, foram notificadas em todo território nacional aproximadamente 2.400.000 de casos da doença, sendo que, deste número, 321.141 casos foram registrados na região norte do Brasil (BRASIL, 2006).

A doença diarréica é definida como o estado em que o indivíduo experimenta uma mudança nos hábitos intestinais caracterizada por freqüentes e inevitáveis eliminações de fezes líquidas e não formadas (mais de três episódios por dia) (BENEDET; BUB, 2001). As

doenças diarreicas, também conhecidas como gastroenterites, podem ser causadas por patógenos como bactérias, parasitas e vírus (MERCK & CO, 2002). A doença diarreica aguda de origem virótica que afeta crianças nos primeiros anos de vida pode ser provocada por diferentes tipos de vírus, entre eles os quais se destacam: os Norovírus, os Adenovírus, Astrovírus e os Rotavírus (MOYO et al., 2007).

O rotavírus é a etiologia mais comum de doença diarreica aguda em crianças com menos de dois anos, sendo o responsável por mais de um milhão de casos relatados de doença diarreica anualmente em crianças menores de quatro anos nos Estados Unidos (SONNEN; HENRY, 2004).

Mundialmente, estima-se que, por ano, aproximadamente 125 milhões de episódios de diarreia por ano são relacionados ao rotavírus, resultando em 500 mil a 600 mil mortes provocadas pela doença. Estudos globais demonstram uma incidência da doença diarreica provocada pelo rotavírus de 12 a 71% em crianças menores de três anos. No Brasil estudos demonstram uma variação de 12 a 42% da doença (COSTA et al., 2004a).

1.2 Histórico

O primeiro relato de diarreia aguda em humanos, provavelmente causada por rotavírus, foi realizado em 1943 por Light & Hodes (apud GILIO, 1991), que isolaram um agente filtrável das fezes de crianças com diarreia aguda, de quatro surtos em berçários de Baltimore e Washington, nos Estados Unidos em 1942 (GILIO et al., 1991). Em 1973, Ruth Bishop (apud GLASS, 2006), bióloga que estudava doenças gastrintestinais no Hospital Real de Crianças, em Melbourne, Austrália, identificou pela primeira vez o rotavírus, na época a bióloga analisava biópsias de tecido duodenal de crianças com diarreia aguda em microscópio

eletrônico e encontrou uma infestação de vírus com formato circular nas células epiteliais da parede do intestino (GLASS, 2006).

Nesta mesma década, Flewtt et al. (apud BREVIGLIERI, 1979), examinando extrato de fezes diarréicas infantis por microscopia eletrônica, identificaram partículas virais com capsídeo de dupla camada e com borda claramente definida (BREVIGLIERI, 1979).

Houve uma polêmica inicial quanto ao nome que deveria ser dado ao novo vírus, sendo que Bishop et al. (apud GILIO et al, 1991), sugeriram por causa da morfologia do vírus, o nome Orbivírus. Já Flewett et al. (apud GILIO et al, 1991), baseando-se no aspecto do vírus, sugeriram Rotavírus, termo derivado do latim “rota”, que significa roda. Ainda Davidson et al. (apud GILIO et al., 1991), considerando o local onde o vírus foi encontrado pela primeira vez em humanos, ou seja, na mucosa do duodeno, sugeriram o nome Duovírus. Finalmente, em 1978, o comitê de taxonomia dos vírus, no 4º Congresso Internacional de Virologia, definiu o termo Rotavírus (GILIO et al., 1991).

No Brasil, o primeiro registro de detecção do vírus foi feito em 1977, por Linhares et al. (apud LINHARES, 2000), em estudos realizados em Belém do Pará. Este estudo, que utilizou a microscopia eletrônica, propiciou a detecção do rotavírus em espécies fecais em 16% dos pacientes estudados. Tais achados representaram o marco inicial de inúmeros outros estudos nos país (LINHARES, 2000).

1.3 Características Morfológicas do Rotavírus

Os rotavírus são partículas arredondadas de 70nm de diâmetro, pertencentes à família *Reoviridae*. Esses vírus podem acometer seres humanos e diversas espécies de animais domésticos e selvagens (BRICKS, 2005)

A partícula viral completa é constituída por três camadas que envolvem o genoma que é composto de 11 segmentos de fita dupla de RNA (Ácido Ribonucléico), sendo que cada segmento codifica uma proteína (MASCARENHAS et al., 2002).

Os segmentos de dupla fita de RNA encontrados no genoma do rotavírus codificam seis Proteínas Virais (Viral Protein) que são as VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7 e cinco proteínas não estruturais (Not Structural Protein) NS53, NS34, NS35 NS28 e NS26 (ESTES, 1989). A estrutura do genoma viral com a seqüência dos segmentos de RNA pode ser visualizada na figura 1.

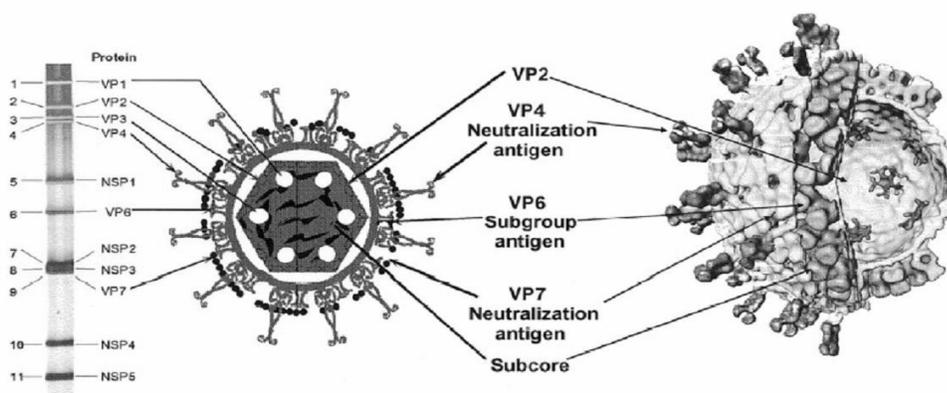


Figura 1 – Estrutura da partícula de rotavírus, correspondência entre os segmentos de dsRNA (esquerda), diagrama esquemático (centro) e reprodução do vírus por crioeletromicroscopia (direita). Localização das proteínas estruturais na partícula de rotavírus do grupo A. (GENTSCH et al., 2005).

O capsídeo interno (camada intermediária) é constituído da proteína VP6 e seu antígeno é usado para caracterizar sete diferentes grupos de rotavírus de A a G. No grupo A a mesma proteína caracteriza quatro subgrupos: I, II, I+II e NãoI-NãoII. O capsídeo exterior consiste das proteínas VP7 e VP4, o qual forma a base do sistema de classificação para os

tipos G (VP7) e P (VP4). A proteína VP7 expressa o antígeno de neutralização principal que é caracterizado por sorologia e técnicas moleculares sendo conhecidos atualmente 15 sorotipos G com uma correlação boa entre a sorologia e as classificações do genoma. A Proteína VP4 também expressa o antígeno de neutralização, porém a sua correlação entre a sorologia e as classificações de genoma são mais difíceis, até o momento são conhecidos 15 sorotipos e 27 genótipos P (MUNFORD et al., 2007). O sorotipo de VP7 recebe a designação G por ser uma glicoproteína, sendo o sorotipo e genótipo designado por um único número (ex. G1) o sorotipo VP4 recebe a designação de P por ser sensível à protease, sendo que o sorotipo é designado por números e, em alguns casos, por letras e o genótipo é expresso em números entre parênteses (ex. P1A[8]) (COLUCHI et al., 2002).

A maioria dos sorotipos de G e P é compartilhada entre humanos e animais, porém 10 dos 15 sorotipos G (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G8, G9, G10 e G12) e nove sorotipos P (P1A, P1B, P2A, P3A, P3B, P4, P5A, P8 e P11) foram, até o momento encontrados em humanos. (COLUCHI et al., 2002). Os genótipos P (P[1], P[3], P[6], P[8], P[11], P[14] e P[9]) são conhecidos por causarem infecção em humanos (BÁNYAI et al., 2004). Embora os sorotipos e genótipos citados já tenham sido encontrados em infecção em humanos, somente cinco combinações de genótipos P e G são prevalentes mundialmente, estas combinações são geralmente encontradas entre o genótipo P[8] com genótipos G1, G3, G4 e G9 e do genótipo P[4] com o genótipo G2, porém os casos de combinações incomuns vêm sendo encontradas, principalmente, em países em desenvolvimento (CASTELLO et al., 2006).

Os rotavírus parecem apresentar maior resistência que outros vírus para altas temperaturas, pH (Potencial Hidrogeniônico) ácido, solventes de lipídios e detergentes não iônicos em geral, eles são extremamente estáveis em condições ambientais, permanecendo na natureza por um período indeterminado de tempo. Além disso, os tratamentos de água convencionais parecem ser menos eficientes na inativação do rotavírus do que em outros vírus

causadores de doenças diarréicas. A associação destes fatores contribui para a disseminação do rotavírus em comunidades e o coloca como uma das principais doenças diarréicas (FERNANDES et al., 2000).

A caracterização genotípica dos de rotavírus é importantes para definir a extensão da diversidade de cepas circulantes em determinada região (RÁCZ et al., 2000), bem como para o desenvolvimento de vacinas contra rotavírus (CARMONA et al, 2006)

1.4 Epidemiologia

A ocorrência universal dos rotavírus é amplamente reconhecida, sabendo-se que praticamente todas as crianças, na faixa etária dos cinco anos já se infectaram. Em geral, a incidência das infecções sintomáticas assume maior expressão na faixa etária de 6 a 24 meses. Em contrapartida prevalecem as formas inaparentes entre recém-nascidos e lactentes até o quarto mês de vida, provavelmente como decorrência da proteção conferida pelos anticorpos de origem materna (BRASIL, 2005). A figura 2 representa a distribuição global de óbitos causados por rotavírus, segundo o COVEH/CGDT e CGDT do DEVEP/SVS/MS.

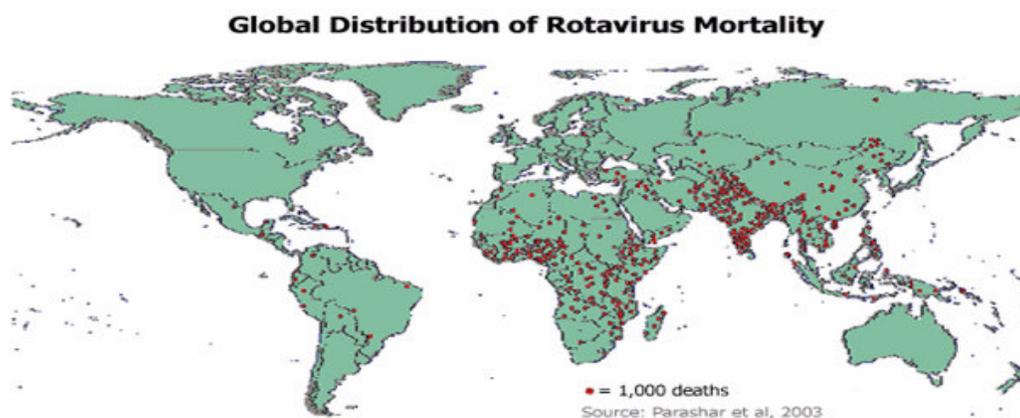


Figura 2 – Distribuição global de óbitos causados por rotavírus (BRASIL, 2005).

Anualmente, estima-se a ocorrência mundial de aproximadamente 130 milhões de casos de diarreias provocadas pelo rotavírus, com conseqüentes 500 mil mortes de crianças abaixo de cinco anos. Acredita-se que, em países subdesenvolvidos, assim como naqueles em desenvolvimento cerca de 1.200 crianças morrem diariamente da doença (VRANJAC, 2004). O que reflete em 20 a 25% do total de óbitos por doença diarreica, bem como 6% da mortalidade global entre crianças com idade inferior a 5 anos (LINHARES, 2000).

A maioria dos estudos epidemiológicos encontrados no Brasil foram realizados no norte e sudeste do país, assim, os dados equivalentes a outras regiões do país, como sul e nordeste são escassos, porém os estudos existentes mostram taxas de prevalência comuns que variam de 12 a 42% de doença diarreica por rotavírus. (LUZ et al., 2005).

Estes estudos são as únicas fontes de conhecimento sobre a doença no Brasil, pois não há dados gerados por órgãos governamentais que possam ser considerados oficiais, sobre a morbidade e a mortalidade de crianças por rotavírus, o que existe são dados relativos a óbitos e internações por doença diarreica em menores de cinco anos, que são relacionadas à doença diarreica por rotavírus (CARMO, 2006).

Com o intuito de minimizar a situação acima citada, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, em 2005, contemplando as cinco regiões do país, implantou em sete municípios: Marituba – Pará, Ceará-Mirim – Rio grande do Norte, Salvador – Bahia, Dourados – Mato Grosso do Sul, Cachoeiro do Itapemirim – Espírito Santo, Lages – Santa Catarina e Paranaguá – Paraná um projeto que tem por objetivo avaliar o impacto da doença causada por esses patógenos no país. (BRASIL, 2005).

Na região Amazônica, os estudos sobre rotavírus iniciaram em 1977, na mesma época da descoberta deste patógeno em âmbito nacional, a partir daí se procurou avaliar a magnitude epidemiológica do problema na região, (LINHARES et al., 1994), sendo que os estudos realizados na última década demonstram que os casos de doença diarreica por rotavírus

variaram entre 18,4% em Belém do Pará (LINHARES et al., 1994) e 46% em Manaus no Amazonas (ROCHA, 2003).

No estado do Amazonas, as informações relativas à doença se concentram na capital, Manaus, em estudos que ocorrem desde a década de 80, quando foi avaliada a presença de rotavírus em 41,1% das amostras de material fecal de crianças menores de cinco anos residentes neste município (COIRO et al., 1983). Costa et al. (1997), estudando os genótipos P e G dos rotavírus humanos na cidade de Manaus, encontraram uma positividade para rotavírus de 31%.

Estudos realizados na última década no município mostram que a variedade de valores permanece como uma constante. Estudo realizado por Costa, (2006) para avaliar os aspectos epidemiológicos de rotavírus na cidade de Manaus detectou, através do método de eletroforese em gel de poliacrilamida – EGPA, que 24% das 294 amostras de fezes diarréicas eram positivas para rotavírus (COSTA, 2006 – Dados não publicados). Já Rocha (2003), na dissertação de mestrado em patologia tropical da Universidade Federal do Amazonas realizou estudo sobre os aspectos epidemiológicos e clínicos da doença diarréica por rotavírus na cidade de Manaus, verificou que em 380 amostras fecais foram encontradas 46% de amostras positivas para rotavírus.

A sazonalidade das doenças diarréicas por rotavírus no Brasil assume duas configurações bem distintas, em consonância com os padrões registrados nas regiões temperadas e tropicais do planeta, a saber: regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul exibem marcante perfil sazonal, observando-se maior incidência da doença nos meses secos (de maio a setembro); em contra partida, nos estados das regiões Norte e Nordeste a sazonalidade não se revela tão marcante, com números de casos semelhantes em todos os meses do ano. (LINHARES. 2000).

1.5 Patogênese

Os rotavírus infectam o hospedeiro (susceptível) através de um comunicante que após o contato com o rotavírus (bioagente) passa a ser um portador (reservatório), que poderá apresentar sinais e sintomas da doença ou ser um portador assintomático. Com a eliminação do bioagente (porta de saída) pelo portador, mantém-se a cadeia de transmissão de modo indireto por meio de mãos, fômites, água ou alimentos contaminados (modo de transmissão). O contato oral (porta de entrada) com o bioagente pela criança não vacinada (susceptível) reinicia a cadeia de transmissão, com esta criança se tornando um comunicante. O período de incubação da doença varia de um a três dias e a transmissibilidade se dá com a máxima excreção nas fezes entre o primeiro e quarto dia do início dos sintomas, porém os vírus já estão presentes nas fezes desde o início das manifestações clínicas até 10 a 12 dias após o término. Na figura 3 é demonstrada a cadeia de transmissão do rotavírus (RIBEIRO, 2006).

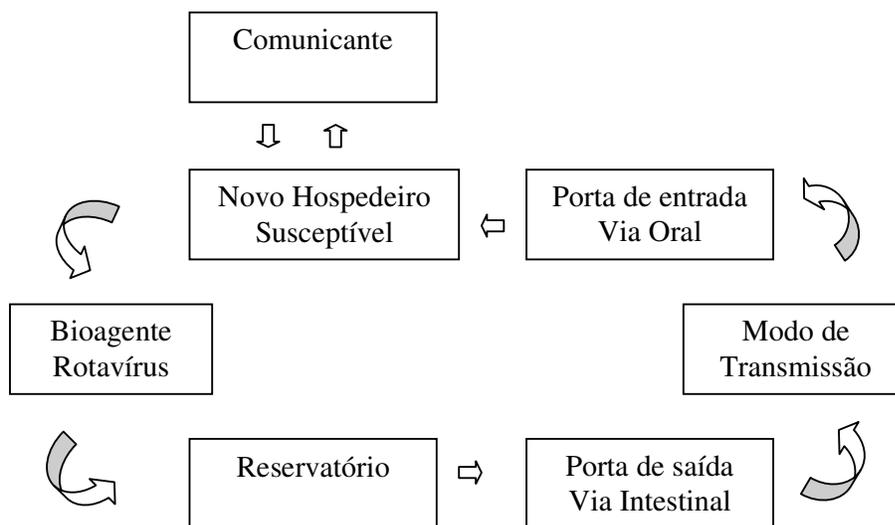


Figura 3 – Cadeia de transmissão predominante na rotavirose (Modificado de RIBEIRO, 2006).

Os mecanismos de ação patogênica do rotavírus não são bem definidos. Sabe-se que a sua replicação acontece principalmente na mucosa jejunal, nas células epiteliais maduras onde a absorção do vírus acontece (FERNANDES et al., 2000)

Após ultrapassarem as barreiras de defesa do trato gastrointestinal, as proteínas VP4 prendem o vírus nas células epiteliais (endotélio) maduras que revestem o intestino delgado. Durante esse espaço de tempo, as proteases atuam sobre os polipeptídios virais, aumentando, assim, a sua virulência (FERNANDEZ et al., 2003).

A proteína VP4 é então fracionada pelas enzimas pancreática, tripsina ou elastina em duas proteínas menores, VP5 e VP8. Após o fracionamento da VP4, o vírus adere às células do epitélio intestinal, ocasionando com isso a multiplicação do vírus nas células epiteliais maduras das vilosidades do intestino delgado; a infecção progride então do intestino delgado proximal para o distal. Até pouco tempo, acreditava-se que poderia haver lesão das células superficiais da mucosa, sem alteração inflamatória na lâmina própria, nas placas de Peyer, ou invasão de outros órgãos, entretanto, recentemente, detectou-se RNA (Ácido Ribonucléico) do vírus no sangue e em alguns órgãos de crianças que tiveram infecção por rotavírus grave (BRICKS, 2005).

Em animais gnotobióticos infectados com rotavírus humano, foram demonstradas grandes alterações microscópicas da mucosa intestinal com achatamento e arredondamento celulares, sendo as células laterais e apicais das microvilosidades as mais afetadas. Porém, não foram detectadas partículas nas células das criptas. Essa destruição celular pode ser responsabilizada pelo mecanismo básico da diarreia de duas maneiras, a primeira quando há destruição das células produtoras das dissacaridases (lactase, maltase, sacarase e isomaltase) com conseqüentes alterações digestivas dos dissacarídeos correspondentes, levando ao colón uma carga osmótica acentuada, com concomitante eliminação de água, e a segunda quando ocorre alteração da função absorvitiva de água e eletrólitos ao nível do intestino delgado alto

(BREVIGLIERI, 1979). Isto pode determinar um aumento na secreção de água e eletrólitos no lúmen intestinal, causando diarreia com desequilíbrio hidroeletrólítico, condição esta que pode levar à desidratação e à morte (FERNANDES et al., 2000)

Estudos, utilizando biópsia do intestino delgado de crianças infectadas com rotavírus, têm mostrado a ausência de lesões histológicas do órgão, o que sugere que a diarreia pode ocorrer sem provocar dano celular, porém ainda não se conhece precisamente os mecanismos pelos quais os vírus causam diarreia, mas a proteína não estrutural NSP4 (Not Structural Protein) parece desempenhar papel importante nesse processo. Em animais infectados por rotavírus, experimentalmente, a NSP4 atua de forma semelhante à enterotoxina da *E.coli*, disparando um sinal de transdução que leva ao aumento do cálcio intercelular e à secreção do cloro para fora da célula, no sentido do lúmen intestinal, levando a diarreia secretora (BRICKS, 2005).

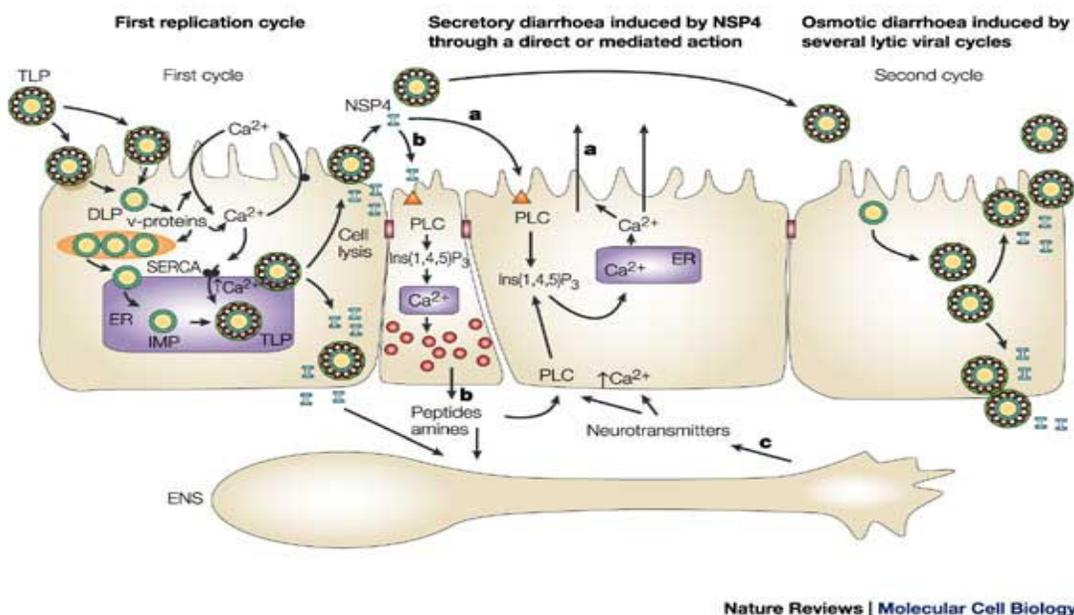


Figura 4 – Fisiopatologia da doença diarreica por rotavírus (BOMSEL; ALFSEN, 2003).

1.6 Manifestações clínicas

As principais manifestações clínicas da doença são: vômitos, diarreia aquosa e febre. Normalmente na doença diarreica por rotavírus, os vômitos são mais intensos e duradouros que nas diarreias agudas provocadas por outros patógenos. Estudos mostram uma média de 2,6 dias de duração desse sinal quando há positividade para rotavírus, contra 0,9 dias quando há negatividade do mesmo. A diarreia é aquosa podendo levar à desidratação e conseqüente, ao aumento da mortalidade, verifica-se que aproximadamente 50% das crianças internadas por infecção diarreica por rotavírus apresentam desidratação de 2º grau, que pode durar de quatro a oito dias. Já a febre precede o início da diarreia entre 30% e 50% dos casos, podendo variar de 38 °C a 41 °C, com uma média de duração de 2 a 3 dias (GILIO et al., 1991).

A chave da conduta é a avaliação do nível de desidratação. Crianças na categoria de desidratação grave podem estar acidóticas, o que requer intervenção imediata. Clinicamente, estas crianças podem apresentar letargia ou sinais de choque (SONNEN; HENRY, 2004).

Percebe-se que em pessoas previamente saudáveis as manifestações clínicas desaparecem em menos de sete dias e, habitualmente, apresentando quadros mais leves com poucas alterações hidroeletrólíticas. Porém, esse dado não exclui quadros graves da doença em pessoas sadias, pois são constatados casos graves da doença em crianças que apresentavam características saudáveis antes da infecção pelo vírus. Em crianças desnutridas, prematuras e pessoas imunocomprometidas, os rotavírus podem apresentar complicações e acometimento de outros órgãos, como rins, fígado e sistema Nervoso Central (BRICKS, 2005).

As reinfecções por diferentes sorotipos de rotavírus são bastante comuns, podendo ocorrer até na mesma estação, sendo que a primeira infecção costuma ser a mais grave e as subseqüentes geralmente são mais leves (BRICKS, 2005).

1.7 Diagnóstico clínico e laboratorial

O diagnóstico da doença diarréica por rotavírus é baseado na história e no exame físico, sendo que os critérios de diagnóstico diferencial devem sempre ser considerados. Em regiões de clima temperado, as doenças diarréicas agudas ocorridas em crianças nas estações mais frias e secas do ano devem sempre incluir rotavírus; já em regiões tropicais, este diagnóstico não deve ser utilizado, tendo em vista que a sazonalidade do vírus é constante em todos os meses do ano.

Outro diagnóstico diferencial é o aspecto das fezes, quando estas apresentarem sangue devem ser considerados agentes bacterianos como *Shiguela*, *E.coli*, *Salmonella*, *yersinia* e *Cmappylobacter* (SONNEN; HENRY, 2004).

Apesar da importância da avaliação das características clínicas da doença diarréica por rotavírus, o seu diagnóstico somente será definitivo através da detecção do vírus nas fezes (RIBEIRO, 2006).

Um dos métodos diagnósticos utilizados para a identificação de rotavírus é a visualização das partículas por microscopia eletrônica e imunoletromicroscopia eletroforese. A visualização de rotavírus por microscopia eletrônica é um método de elevada eficiência e rapidez, mas exige obviamente aparelhagens de custo elevado, além de apresentar limitações de ordem operacional, quando o número de exames diários é superior a duas dezenas, situação esta de ocorrência freqüente (CANDEIAS et al., 1978).

Este motivo acarretou o surgimento de várias técnicas como a fixação do complemento, que foi considerado na época como pouco promissor dado que os extratos fecais são frequentemente anticomplementares (CANDEIAS et al., 1978), imunoflorescência em mucosa duodenal, imunoletroosmoforese, contra-imunoletroosmoforese, precipitação fluorescente, eletroforese do RNA viral, imunoflorescência das fezes, rádio imunensaio e enzima-imunensaio. Algumas dessas técnicas mostraram sensibilidade menor que a

microscopia eletrônica, passando, assim, a serem pouco utilizadas para fins diagnósticos, (GILIO et al., 1991).

No entanto, a técnica de enzima-imunossaiologia logo se mostrou bastante prática, fácil e barata, além de uma sensibilidade tão grande quanto à microscopia eletrônica, assim esta técnica passou a ser amplamente utilizada para fins diagnósticos (GILIO et al., 1991).

Outra técnica de identificação do antígeno viral que se mostrou bastante promissora foi a APL (Aglutinação em Partículas de Látex), a técnica oferece boa sensibilidade e é muito útil para testes de triagem, por ser rápido, de fácil execução e de grande valor, quando há uma redução significativamente o número de amostras a serem analisadas, sendo atualmente o mais recomendado para diagnóstico em hospitais pediátricos (SILVEIRA, 2005).

Para detecção do genoma viral são empregadas as técnicas de EGPA (eletroforese em gel de poliacrilamida), o RT-PCR (reação em cadeia de polimerase associada à reação de transcriptase reversa) e a hibridação de ácido nucléico combinado com “norten blot” (ROCHA, 2003).

A EGPA é uma técnica que apresenta sensibilidade da ordem de 97,14%, quando comparada com o ensaio imunoenzimático, tendo ainda a vantagem de detectar amostras que não possuem antígenos comuns do grupo A. Dada a sua simplicidade, a eletroforese em gel de poliacrilamida permite um diagnóstico etiológico rápido do quadro diarréico, tornando, assim, possível interromper medicação antibiótica instituída, frente a uma suspeita de diarreia bacteriana. Constitui-se ainda em instrumento útil da vigilância epidemiológica, permitindo definir surtos epidêmicos ocasionados por diferentes tipos eletroforéticos de rotavírus, caracterizar sua origem e acompanhar sua evolução. (COSTA et al, 1990).

O RT-PCR é utilizado para identificação da sucessão de nucleotídeos comuns aos genótipos P e G. Os genótipos são identificados pela diferença no peso molecular dos fragmentos de DNA (Ácido Desoxirribonucléico) sintetizados na presença de primers

específicos para cada genótipo e, posteriormente, são separados através de eletroforese em gel. (CHISHIKOV et al., 2002).

É possível também realizar o diagnóstico do rotavírus através de cultura do vírus (ROCHA, 2003).

1.8 Tratamento

A terapia inicial para a doença diarréica por rotavírus é a hidratação oral, se esta puder manter o balanço hídrico, nenhuma outra conduta deve ser adotada. A reidratação endovenosa é geralmente necessária quando houver falhas na reidratação oral.

Tabela 1

Esquema de tratamento da doença diarréica por rotavírus, modificada de SONNEN; HENRY, 2004.

Tratamento Primário	1. Reidratação oral deve ser utilizada em pacientes com desidratação isotônica leve (5%) ou Moderada (10%)
	2. Reidratação parenteral deve ser reservada a pacientes com desidratação moderada á grave para corrigir distúrbios hidroeletrólíticos.
	3. O uso de antitérmicos é recomendado quando houver febre e irritabilidade.
	4. A alimentação deve ser inserida lentamente quando o vômito não estiver mais presente.
	5. Há suspensão da lactose não é recomendada.
	6. A correção de sódio deve ser feita lentamente.
	7. Agentes antidiarréicos são contra-indicados.

Pacientes com desidratação grave devem receber reidratação parenteral imediata e deve-se manter monitorização constante do seu estado hemodinâmico. Pacientes que apresentem hipo

ou hipernatremia (teor de sódio no sangue) devem ser reidratados lentamente devido ao déficit de água livre ou sódio (SONNEN; HENRY, 2004).

1.9 Imunidade

As informações relativas à resposta imune nas infecções por rotavírus, quer no tocante à prevalência de anticorpos, quer quanto à dinâmica de aquisição da imunidade ainda são limitadas (LINHARES, 2000), muito embora, acredite-se que até 4-5 anos, 70% das crianças adquiram imunidade natural para a doença (KALE et al., 2004).

Já é definido que as proteínas VP7 e VP4 produzem imunidade sorotipo-específica. Esta característica foi utilizada em parte para o desenvolvimento de vacinas que incorporam os sorotipos e genótipos dos rotavírus humano considerados mais importantes (RAMACHANDRAN et al., 1998a)

Por acreditar-se que esta imunidade sorotipo-específica tem um papel de fundamental importância na proteção contra a doença diarreica por rotavírus, é que o conhecimento da epidemiologia dos sorotipos e genótipos P e G circulantes em determinadas regiões são fundamentais para o desenvolvimento de vacinas contra rotavírus (UCHIDA et al., 2006).

Os marcadores específicos da infecção por rotavírus são as imunoglobulinas específicas para rotavírus (IgA - Imunoglobulina A) e anticorpos de IgM (Imunoglobulina M) em suco duodenal. (ARGÜELES et al., 2000).

A presença da IgM sérica específica é detectada sete dias após a infecção natural ou a imunização, já a IgA secretora é detectada na saliva, no suco duodenal e nas fezes, após sete a 28 dias. Havendo um aumento nos títulos de anticorpos séricos das classes IgA e IgG (Imunoglobulina G) que é observada após 20 dias. A resposta celular também é importante, particularmente para eliminações dos vírus (BRICKS, 2005).

A natureza assintomática das infecções por rotavírus em neonatais pode ser explicada pela aquisição de anticorpos maternos (ARGÜELES et al., 2000). Estudo realizado nos Estados Unidos por Rachamandran e colaboradores, (1998) demonstrou que os rotavírus incomuns infectam preferencialmente neonatos nascidos de mães com baixos níveis de anticorpos para estes tipos de rotavírus, sugerindo, assim, que a imunidade para a infecção neonatal possa ser conferida transplacentariamente através de anticorpos neutralizantes maternos (RAMACHANDRAN et al., 1998b)

1.10 Vacina contra rotavírus

As vacinas contra rotavírus vêm sendo testadas desde 1983, quando Francis André, da Atual GLAXOSMITH-KLINEBIOLOGICALS, Rixensart, Bélgica e Timo Vesikari, pediatra da Universidade de Tampere, Finlândia, prepararam e testaram uma vacina derivada de uma cepa encontrada em bovinos. Os primeiros testes com a vacina foram realizados na Finlândia e demonstraram que a vacina diminuiu em 88% as chances de uma criança ter uma infecção grave, os testes com vacina demonstraram também que a imunidade poderia ser induzida por uma vacina oral, porém outros testes realizados no Peru e na África apresentaram inconsistências nos resultados e com isso o programa foi suspenso pela companhia (GLASS, 2006).

Em 1991, a FDA (*Food and Drug Administration*) concedeu permissão para a companhia farmacêutica Wyeth Ayerst produzir e testar uma nova vacina contra rotavírus, nomeada como RotaShield® (GLASS, 2006). O imunizante empregado nesta vacina consistia em preparação tetravalente, reunindo rotavírus de origens símia e humana, A vacina em questão, que originalmente foi designada como *rhesus-human reassortant rotavirus tetravalent vaccine*, *RRV-TV*, que reunia na sua composição quatro cepas atenuadas distintas,

sendo três amostras com especificidades antigênicas para G1, G2 e G4, obtidas por reestruturação genômica *in vitro* envolvendo rotavírus de origens humana e símia (*RRV*); e a própria cepa *RRV*, homóloga ao G3. Em 1998, a vacina foi licenciada pelo FDA para uso nos Estados Unidos (LINHARES, 2000). Porém, em 1999, a vacina foi retirada do mercado, depois que se encontrou uma associação entre a sua utilização e um tipo raro de intussuscepção intestinal (GLASS, 2006).

Com a saída da RotaShiel® do comércio mundial, as indústrias farmacêuticas retomaram trabalhos com o intuito de desenvolver novas vacinas contra o rotavírus. Assim, a própria GlaxoSmithKline lançou, em 2004, em nível mundial, a RotaRix®, vacina que foi testada principalmente na América Latina, esta é uma vacina monovalente, elaborada com vírus humano atenuado e confere proteção contra os sorotipo G1 e P8 da cepa RIX4414 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Em estudos, que incluíram o Brasil, foram realizados na América Latina e Europa, a vacina RotaRix® se mostrou altamente eficaz para prevenir a doença diarreica severa por rotavírus. Com o apoio destes estudos a vacina foi introduzida no Programa Nacional de Imunização (PNI) a partir de março de 2006, com administração de 2 doses aos 2 e 4 meses de vida. (GURGEL et al., 2007)

No momento, outras vacinas estão sendo desenvolvidas, a MerkSharpDome, desenvolveu uma vacina pentavalente, denominada Rotateq® onde são utilizadas cinco cepas humanas e bovinas reagrupadas, quatro desses reagrupados contêm um gene que codifica uma variante de VP7 humana que confere imunidade contra os genótipos G1, G2, G3 e G4, o último carrega um gene de vírus humano na forma de P[8] da proteína VP4. No Brasil, o Instituto Butantã (São Paulo) está elaborando uma vacina com foco nos sorotipos mais comuns no Brasil. Da mesma forma que a Rotateq® a vacina brasileira deve ser pentavalente com rearranjo de gene de vírus humanos e bovinos (G1, G2, G3 e G4). Além da vantagem de

fornecer um produto mais específico para a realidade nacional, o Instituto Butantã tem como meta diminuir os custos da vacina. Hoje, o Brasil gasta sete dólares por dose da vacina RotaRix® da Glaxo, enquanto que a produzida no Brasil deverá custar por volta de um dólar. (GLASS, 2006).

1.11 Prevenção e controle

A maioria das mortes ocasionadas por doença diarréica por rotavírus acontece em países em desenvolvimento, embora empiricamente todas as crianças apresentem infecção por rotavírus até o quinto ano de vida, independentemente se estas crianças sejam moradoras de países desenvolvidos ou em desenvolvimento. Assim, fica claro que os padrões de higiene praticados em países desenvolvidos não são suficientes para prevenir a expansão da infecção por rotavírus dentro de comunidades (UCHIDA et al., 2006)

Apesar das medidas de higiene se mostrarem pouco eficazes na prevenção da doença diarréica por rotavírus, algumas medidas são estabelecidas como conduta para o controle da doença. Uma dessas medidas é o saneamento básico, com a utilização de água tratada e com o destino adequado de dejetos. Um estudo realizado em 2007 para avaliar a presença de vírus causadores de gastroenterites em amostras de água em fluxos da bacia hidrográfica nos arredores da cidade de Manaus, AM constatou a presença do rotavírus em 44,2% das amostras de água coletadas (MIAGOSTOVICH et al., 2007).

Outras medidas de controle são as de higiene ambiental que incluem a desinfecção concorrente de superfícies e objetos que entram em contato com fezes humanas, o descarte adequado de fraldas descartáveis e a lavagem correta de fraldas de tecido, bem como as medidas de higiene pessoal que incluem principalmente, a lavagem de mãos. A higiene no preparo de alimentos, o estímulo ao aleitamento materno, as campanhas de orientação em

instituições que abrigam crianças como creches e escolas, a adoção de precauções entéricas para pacientes internados e em creches (com especial atenção às crianças e pacientes sem controle esfinteriano) são também medidas que devem ser tomadas para controle da doença diarréica por rotavírus (RIBEIRO, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Analisar a ocorrência de genótipos com características de rotavírus humano em amostras de fezes diarréicas de crianças de 1 a 36 meses atendidas em prontos socorros infantis do Município de Manaus–AM, durante os anos de 2004 a 2006.

2.2 Específicos

- 2.2.1. Verificar a ocorrência de rotavírus em amostras de fezes diarréicas de crianças de 1 a 36 meses atendidas em prontos socorros infantis do município de Manaus.
- 2.2.2. Descrever a epidemiologia molecular dos genótipos G e P do rotavírus humano no município de Manaus, AM.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo do Estudo

Para analisar a ocorrência de genótipos com características de rotavírus humano em amostras de fezes diarréicas de crianças de 1 a 36 meses atendidas nos prontos socorros infantis do município de Manaus durante o período de 2004 a 2006, optou-se por um estudo descritivo, prospectivo.

3.2 Universo de Estudo

População de referência: crianças com doença diarréica atendidas em prontos socorros infantis do município de Manaus durante o período de 2004 a 2006.

População de Estudo: crianças de 1 a 36 meses, de ambos os sexos, com diarréia aguda, atendidas nos prontos socorros HPSC (Hospital e Pronto Socorro da Criança) Zona Sul, HPSC Zona Leste e HPSC Zona Oeste e ICAM (Instituto de Saúde da Criança do Amazonas).

3.2.1 Participantes

Foram incluídas na pesquisa as amostras fecais que preencheram os seguintes critérios: Amostras fecais de crianças de ambos os sexos na faixa etária de 1 a 36 meses, atendidas em prontos socorros infantis do município de Manaus-AM durante os anos de 2004, 2005 e 2006.

Foram excluídas da pesquisa as amostras que preencheram os seguintes critérios:

1. Amostras fecais coletadas de crianças sem o devido preenchimento e assinatura pelos pais ou responsáveis pelo menor; do termo de consentimento livre e esclarecido;
2. Amostras fecais coletadas de crianças de origem indígena;
3. Amostras fecais coletadas de crianças com idade superior a 36 meses e menores de 1 mês de vida.

3.3 Coleta de amostras fecais

As coletas de amostras fecais tiveram início em julho 2004 após a aprovação pelo CEP-INPA (Comitê de Ética e Pesquisa – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) do projeto temático de pesquisa, N. 236/2003, processo N. 1415/2005 proposto à FAPEAM (Fundação de Amparo as Pesquisas do Estado do Amazonas) pelo Dr. Cristóvão Alves da Costa para avaliação da epidemiologia molecular das infecções por Rotavírus e Astrovírus na população infantil da cidade de Manaus/AM, e terminaram em dezembro de 2006, com o acúmulo de um total de 607 amostras coletadas.

As amostras de fezes foram coletadas de crianças do sexo masculino e feminino, na faixa etária de 1 a 36 meses, com quadro clínico de infecção diarréica, atendidas nos Prontos Socorros HPSC (Hospital e Pronto Socorro da Criança) Zona Sul, HPSC Zona Leste e HPSC Zona Oeste e ICAM situados no município de Manaus, AM.

Por ocasião da coleta os pais ou o responsável pela criança foram devidamente esclarecidos sobre os objetivos, riscos ou possíveis danos que poderiam vir a ocorrer com as crianças, se estas fossem incluídas no estudo, havendo concordância com os termos, o responsável em questão assinava o termo de consentimento livre e esclarecido.

Com o consentimento dos pais ou do responsável pela criança, iniciou-se a coleta dos dados epidemiológicos sobre as condições sociais e as características clínicas das crianças.

Estes dados foram obtidos por meio de entrevista com os pais ou responsável. Para as entrevistas foram empregados formulários contendo perguntas objetivas.

Após coleta de dados epidemiológicos acontecia então a coleta da amostra fecal, que era realizada através de excreção espontânea. Após coletadas as amostras, estas eram acondicionadas em recipiente plástico ou de vidro esterilizado com capacidade de 10 ml e mantidas sob refrigeração de -20°C , permanecendo nessa temperatura também durante o armazenamento e transporte até o laboratório de virologia e imunologia do INPA (Instituto de Pesquisas da Amazônia). No INPA, as amostras eram numeradas e catalogadas em banco de dados de planilha Excel, os formulários de entrevistas eram arquivados em fichários que seguiam a mesma numeração das amostras. As amostras permaneciam armazenadas nas mesmas condições de temperatura citadas acima até o momento do processamento pelo método de EGPA, para se verificar a detecção de rotavírus.

3.4 Método laboratorial

3.4.1 Detecção de rotavírus pela eletroforese em gel de poliacrilamida do genoma viral (dsRNA – EGPA)

A técnica da eletroforese em gel de poliacrilamida para o genoma viral de rotavírus foi realizada como descrito em Pereira et al. (1983), seguindo o seguinte protocolo:

3.4.1.1 Extração do genoma viral

Foram preparadas suspensões de fezes a 10-15% em tampão Tris/ Ca^{++} pH 7.3 (Tris base 0,1M, CaCl_2 1,5 mM) em microtubo de 1,5 mL. Após o preparo, as amostras foram submetidas à agitação até sua completa homogeneização em aparelho de agitação de tubo de ensaio. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 2.500g por 30 minutos a 4°C , obtendo-se um clarificado das fezes.

A extração do RNA viral foi feita em microtubos de 1,5 mL, utilizando-se 700 µL do clarificado fecal, que foram acrescentados de 80 µL de Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%. Após incubação em banho-maria a 37°C por 30 minutos foram adicionados 300 µL de fenol e 300 µL de clorofórmio. Os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 30 minutos com agitações periódicas e centrifugados a 2.500g por 30 minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para microtubos previamente identificados, evitando colher a interfase. O RNA foi precipitado por adição de 50 µL de Cloreto de sódio (NaCl) a 20% e 950 µL de etanol, os microtubos foram agitados e incubados a -20°C por 18 horas.

Após este período foram novamente centrifugados a 13.000g por 30 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos foram secos com os tubos em posição invertida à temperatura ambiente. Depois de secos, os sedimentos foram ressuspensos em 50 µL de solução dissociadora (Tris base 0,0625M pH 6,8, uréia 5M, SDS 3%, 2-Mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 1,0 %). A seguir, os tubos, contendo os sedimentos e a solução dissociadora, foram incubados em banho-maria a 56°C durante 15 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para amostra de rotavírus humano previamente identificada e que era usada como referência controle e empregada na proporção de 5 µL da amostra para 15 µL de solução dissociadora.

3.4.1.2 Preparo do gel de poliacrilamida

O sistema para processamento do gel de poliacrilamida empregado nesse trabalho era do tipo artesanal baseado em processo industrializado. Foram montados os recipientes de gel, preparados com duas placas de vidro separadas entre si por espaçadores de plástico ou acrílico de 1 mm, as junções das placas foram seladas com ágar 2%. Preparou-se o gel separador composto de acrilamida 7,5%/bis-acrilamida 0,2%; tampão Tris base 3mM pH 8,8; persulfato de amônia 0,03mM e tetrametilenodiamina (TEMED) 0,2%, que foi imediatamente

adicionado à placa até 0,5 cm abaixo da extremidade inferior do pente. Sobre a superfície foi adicionado butanol para nivelar o gel. Após sua polimerização, foi adicionado o gel concentrador preparado com acrilamida 3,5%/bis-acrilamida 0,2%; tampão Tris base 6 mM pH 6,8; persulfato de amônia 0,015 mM e TEMED 0,2%, que foi adicionado sobre o gel separador já polimerizado, colocando-se o pente para a formação de canaletas, para a aplicação das amostras, preparadas como descrito anteriormente.

Após a completa polimerização do gel as placas foram fixadas à cuba de eletroforese, de forma que o nível mínimo da placa (pente) ficou situado a aproximadamente 2 a 3 cm do nível do reservatório superior da cuba; foram vedados os contatos entre os reservatórios com ágar 2% e o tampão de corrida (Tris 0,01M; glicina 0,083 M; pH 8,3) foi adicionado aos reservatórios superior e inferior da cuba de corrida. Na seqüência, foi retirado o pente e adicionado 20 µL de cada amostra em cada canaleta do gel, a amostra padrão sempre foi colocada na canaleta à esquerda do gel. Depois de todas as amostras colocadas, a fonte de energia foi ligada, ajustando-se a corrente elétrica em mA por placa. Após a saída do corante azul de bromofenol do gel a fonte foi mantida ligada por mais 30 minutos para finalizar a corrida de eletroforese.

3.4.1.3 Coloração do gel com nitrato de prata.

O gel foi corado com nitrato de prata de acordo com a técnica descrita por Herring et al. (1982). A coloração foi executada seguindo as seguintes etapas: as placas com o gel foram retiradas da cuba de eletroforese, foram abertas e retirados os espaçadores, restando só o gel, que foi transferido para uma solução fixadora de etanol 10% e ácido acético 0,5%, por 30 minutos; a seguir o gel foi transferido para a solução corante de nitrato de prata 0,01 M, por mais 30 minutos, com agitações periódicas. Desprezou-se a solução corante e o gel foi lavado por 2 vezes em água destilada e em seguida acrescentou-se a solução reveladora de hidróxido

de sódio (NaOH) 0,75 M e formaldeído 0,95%. Após a visualização das bandas a revelação foi interrompida pela adição de uma solução de ácido acético 5%, por 15 minutos. Na seqüência, o gel foi mantido em uma solução de etanol a 10%, que funciona como conservante do gel até o momento de fotografar e/ou secar.

3.4.1.4 Secagem do gel

Para secagem do gel, a solução de etanol foi desprezada, adicionando-se uma solução de secagem, composta por metanol 65%, etanol 10%, glicerol 0,5%. Duas folhas de celofane foram embebidas nesta solução, uma das folhas de celofane foi usada para recobrir uma placa de vidro, sendo o gel colocado sobre ela e sobre o gel foi colocada a outra folha de celofane, de forma que a placa de vidro fosse totalmente envolvida. Após 2 dias, à temperatura ambiente, com o gel totalmente seco, este foi retirado da placa de vidro e guardado para posterior análise.

3.4.1.5 Fotografia do gel

Para fotografar os géis, antes da secagem utilizou-se um sistema de fotografia digital acoplado a um microcomputador e impressora, sendo os resultados registrados de forma digital.

3.4.2 Caracterização molecular das amostras de rotavírus em genótipos P (VP4) e G (VP7) por meio da Reação da Polimerase em Cadeia – PCR.

As amostras de fezes diarréicas que apresentavam positividade para rotavírus através de EGPA eram encaminhadas para análise do genótipo através de técnica de RT-PCR (Transcriptase Reversa – Reação de Polimerase em Cadeia), utilizando “Primers” específicos

para o gene 4 (VP4) e para o gene 9 (VP7), de acordo com técnicas descritas por Gentsh et al. (1992) e Gouvea et.al. (1990; 1994a, b) com algumas modificações.

3.4.2.1 Extração do ácido ribonucléico (RNA) viral para a reação de Transcriptase Reversa seguida da Reação da Polimerase em Cadeia (RT-PCR).

Para caracterização do genótipo P (VP4) e G (VP7), o RNA dos rotavírus era extraído diretamente das fezes, de acordo com metodologia descrita por Santos; Gouveia (1994).

Procedeu-se à extração do RNA viral a partir do clarificado das amostras, utilizando-se Trizol® Reagent (Invitrogen do Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

Em microtubos de 1,5 mL, misturou-se um volume de 250 µL do clarificado da suspensão fecal e 750 µL de Trizol®. A mistura foi homogeneizada em agitador de tubo de ensaio e, na seqüência, foram adicionados 200 µL de clorofórmio, seguido de agitação no aparelho durante 30 segundos e incubado por 5 minutos a 4°C.

Depois de incubadas, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5417R) a 10.000g durante 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, transferiu-se a fase superior aquosa para outro tubo previamente identificado. O RNA viral foi precipitado por adição de igual volume de álcool isopropílico e incubado durante 10 minutos a 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5417R) a 10.000g por 10 minutos a 4°C. O sedimento resultante da centrifugação foi lavado com 800 µL de etanol 75% gelado, homogeneizado em agitador de tubo de ensaio e centrifugado a 10.000g por 5 minutos a 4°C. Vertendo-se rapidamente o conteúdo do tubo, obteve-se só o sedimento. A secagem do sedimento foi feita com o tubo em posição invertida, no fluxo de ar da capela do fluxo laminar.

Depois de seco, o RNA sedimentado foi resuspenso em 30 µL de água estéril livre de RNase e DNase e estocado a -70°C até o momento de uso.

3.4.2.2 Transcriptase reversa seguida da Reação da Polimerase em Cadeia (RT-PCR).

Na primeira amplificação para a detecção dos genes 4 e 9 dos rotavírus, foram utilizados os RNAs dos vírus extraídos como moldes para serem transcritos em cópias de DNAs (cADN) para em seguida serem genotipados por PCR.

Foram realizadas reações separadas para (VP4 e VP7). Utilizou-se para cada reação 5µl do RNA viral juntamente com 3 µL de DMSO (Dimetilsufóxido), formando uma amostra de 8 µL que era aquecida a 95 °C por 5 minutos, para abrir e manter a fita dupla de RNA aberta. Após este período, as suspensões eram imediatamente resfriadas em banho de gelo por cinco minutos, e adicionados 42 µL da seguinte mistura: 14 µL de água destilada esterilizada, 16 µL da mistura de Dioxinucleotídeos Trifosfato (Contendo soluções dATP, dGTP, dCTP, dTTP 1,25mM), mais 5 µL de solução tampão da reação 10 vezes concentrada (Contendo TRIS-HCl 100mM pH 9,0; KCl 500mM), outros 5 µL de solução de MgCl₂ (Cloroeto de Magnésio) 25mM, 2µL da solução de cada “primers” contendo 25µM de con2-con3 para amplificar todo o gene 4 e 2 µL da solução de “primers” contendo 20µM de Beg9-End9 para amplificar todo o gene 9 foram acrescentados ainda 4 unidades da enzima Transcriptase Reversa e 2,5 Unidades da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen do Brasil).

Os tubos contendo a mistura foram colocados em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradiente) programado para incubação de 42°C por 45 minutos, para a etapa da transcriptase reversa e obtenção do cADN. Em seguida, os mesmos tubos eram submetidos a série de 30 ciclos de amplificação a 94°C por um minuto, 42°C por dois minutos e 72°C por mais um minuto, e a uma incubação final de extensão a 72°C por sete minutos.

3.4.2.3 Reação de PCR para genotipagem viral

Nesta etapa, 1 µL do produto da primeira amplificação foi utilizado como molde para identificação dos genótipos P (VP4) e G (VP7). Neste caso, as cópias de DNA amplificadas

foram adicionadas à mesma mistura utilizada na primeira amplificação, porém em quantidades reduzidas, sem a enzima transcriptase reversa e utilizando “primers” específicos para os diferentes genótipos P (Con3, 1T-1, 2T-1, 3T-1, 4T-1, 5T-1) e para os genótipos G (Beg9, End9, aBT1, aCT2, aDT4, aET3 e aFT9).

Foram adicionados 21 µL da seguinte mistura: 7 µL de água destilada esterilizada, 8 µL da mistura de dioxinucleotídeos trifosfato (contendo soluções de dATP, dGTP, dCTP e dTTP 1,25mM), 2,5 µL de tampão 10 vezes concentrado (contendo TRIS-HCl 100mM, pH 9,0; KCl 500mM), 2,5 µL da solução de MgCl₂ 25mM, 1 µL do “pool” de “primers” específico para cada genótipo e 2,5 unidades da enzima Taq DNA-Polimerase (Invitrogen do Brasil).

Os tubos foram novamente colocados em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) programado para 25 ciclos de PCR a uma incubação de 94°C por 1 minuto, 50°C por dois minutos e 72°C por mais um minuto e a uma incubação de extensão final de 72°C por sete minutos.

3.4.2.4 Iniciadores (Primers) utilizados

Para definir os genótipos P (VP4) das amostras de rotavírus, foram inicialmente utilizados “pool de Primers” para genótipos P1A[8], P1A[4], P2A[6], P[9], P4[10]. Este “pool de primers” está demonstrado na tabela 2.

Para definir os genótipos G (VP7) das amostras de rotavírus, foram inicialmente utilizados “pool de primers” específicos para os sorotipos G1, G2, G3, G4 e G9. Este “pool de primers” está demonstrado na tabela 3.

Para evitar a ação de inibidores e contaminantes inespecíficos na reação, todos os reagentes e materiais utilizados eram esterilizados, livres de DNase, RNase e de protease.

Para controle de qualidade de cada PCR, foram utilizados dois controles negativos (Água destilada esterilizada) e um controle positivo (RNA preparado de uma amostra fecal positiva para rotavírus).

Tabela 2

“Pool de Primers” para definição dos genótipos P

Primers	Seqüência 5-3	Posição	Amostra sorotipo e genótipo
Con-3	TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A	11-32	KU (P1A[8])
Con-2	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	868-887	KU (P1A[8])
1T-1	TCTACTTGG ATA ACG TGC	339-356	KU (P1A[8])
2T-1	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	474-494	RV5 (P1B[4])
3T-1	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	259-278	1076 (P2A[6])
4T-1	TGA GAC ATG CAAT TGG AC	385-402	KB(P3A[9])
5T-1	ATC ATA GTT AGT AGT CGC	575-594	69M(P4[10])

Tabela 3

“Pool de Primers” para definição do genótipo G

Primers	Seqüência 5-3	Posição	Amostra sorotipo e genótipo
Beg 9	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	1-28	Wa (1)
End 9	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	1062-1036	SA11(3)
aBT1	CAA GTA CTC AAA CAC ATG ATG G	314-335	Wa (1)
aCT2	CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G	411-435	DS1 (2)
aDT4	CGT TTC TGG TGA GGA GTT G	480-498	ST3 (4)
aET3	CGT TTG AAG AAG TTG CAA CAG	689-709	P (3)
aFT9	ATC GAT GAT ACT ACA ACT AC	757-776	W161 (9)

3.4.2.5. Análise do perfil genômico viral por Eletroforese em Gel de Agarose

Alíquotas de sete microlitros dos produtos da primeira e segunda amplificação homogeneizados com 3µl de tampão de corrida (Azul de bromofenol a 0,1%, EDTA 0,1mM e glicerol a 50%) foram aplicados em gel contendo 1,2% de Agarose (Invitrogen do Brasil) em Tampão TRIS-Borato (TBE-TRIS 0,089 M, Ácido Bórico 0,089 M e EDTA 0,002M, pH 8,0), com 0,5µg de brometo de etídeo por mililitro. Para cada gel foram aplicados 3µl do marcador de peso molecular com 100 pares de base (100 bp DNA Ladder – Invitrogen do Brasil).

Em seguida, os géis eram submetidos a uma corrente elétrica de 120V por uma hora em temperatura ambiente. Após a eletroforese, os géis eram analisados por transiluminação com luz ultravioleta e fotografados com câmara digital.

3.5 Análises Estatísticas

A análise dos dados foi realizada por meio de análise de médias, desvio padrão e porcentagens para a verificação dos dados obtidos nas amostras de fezes diarréicas de crianças de 1 a 36 meses, conforme idade, sexo e condições clínicas.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Epi-info versão 3.3.2/2005 (Center for Disease Control and prevention – CDC/USA e World Health Organization – Geneva). O Epi Info™ 3.2.2 foi utilizado para construção do questionário, do banco de dados e análise estatística e epidemiológica de dados.

O Epi Info 3.2.2™ é um conjunto de programas de domínio público, produzido pelo CDC que funciona na mesma concepção visual do Windows, com apresentação de menus de opções. Para armazenar dados, utilizando a mesma concepção do Access, da Microsoft (CDC_EPI-INFO_AULA 3_Portug, 2006).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Positividade para rotavírus

Durante o período do estudo foram analisadas por EGPA (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida) 607 amostras de fezes, sendo que destas 152 (25%) apresentaram positividade para rotavírus.

A porcentagem de amostras positivas para rotavírus encontradas nesse estudo é demonstrada no gráfico 1.

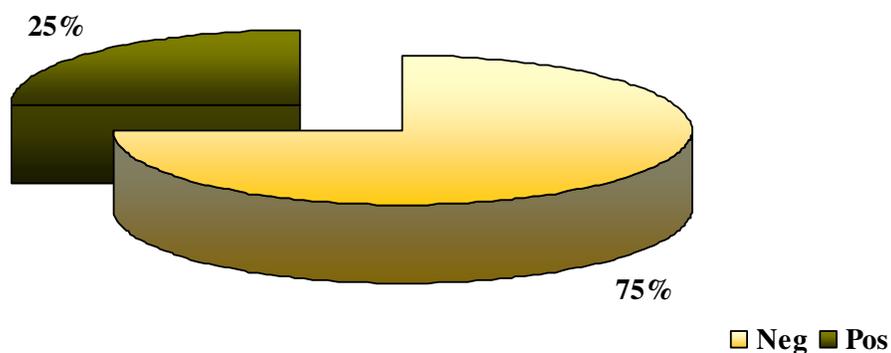


Gráfico 1 – Positividade para rotavírus humano em amostras de fezes diarréicas coletadas de crianças de 1 a 36 meses em Manaus-AM, de julho de 2004 a dezembro de 2006.

Estudos realizados na última década no Brasil demonstram que a positividade para rotavírus no país varia de 11,9 a 48 % (SILVA et al., 2001; COSTA et al., 2004b; SANTOS et al., 2003; SANTOS et al., 2005; CARVALHO-COSTA et al., 2006; ORLANDI et al., 2006).

Na região Amazônica os rotavírus foram encontrados entre 18,4% em Belém do Pará (LINHARES et al., 1994) e 46%, em Manaus-Amazonas, por Rocha (ROCHA, 2003).

Os dados encontrados neste estudo (25%) são semelhantes ao encontrado por Costa, (2006 - trabalho não publicado) em estudo sobre a ocorrência de rotavírus Manaus-AM. Naquele estudo, Costa encontrou 24% das amostras positivas para rotavírus.

Em alguns países da América do Sul, a porcentagem encontrada de amostras positivas para rotavírus foi de até 48,1% das crianças na Colômbia (MANRIQUE-ABRIL et al., 2006) e de 49% no Chile (VERGARA et al., 2007).

A positividade para rotavírus foi semelhante tanto no sexo feminino com 76 amostras (50%), quanto no masculino também com 76 amostras (50%). Este dado é semelhante ao verificado por Carneiro et al. (2005), quando este estudava as características clínicas e epidemiológicas de crianças internadas por rotavírus na cidade de Salvador, estado da Bahia, Brasil. Os autores deste trabalho constataram que 53% das amostras positivas para rotavírus eram de crianças do sexo masculino, enquanto que 47% eram de crianças do sexo feminino. O gráfico 2 mostra a porcentagem de amostras positivas e negativas para rotavírus por sexo das crianças.

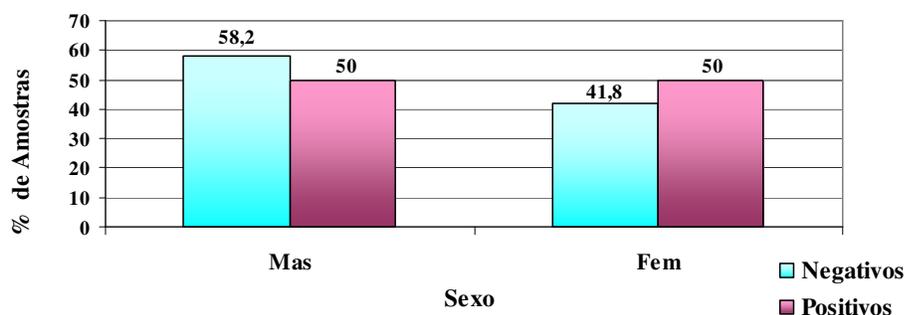


Gráfico 2 – Percentual de amostras positivas e negativas para rotavírus humano, em crianças de 1 a 36 meses do sexo masculino e feminino em Manaus, AM.

A faixa etária onde mais predominou a positividade para rotavírus foi a de 06 a 12 meses, com 49 amostras, o equivalente a 32,2% do total de amostras positivas, este total foi seguido pela faixa etária de 12 a 18 meses com 38 amostras (25%) e pela faixa etária de 1 a 6 meses, onde foi encontrado 30 casos (19,7%). Nas faixas etárias acima dos 19 meses, os casos positivos para rotavírus diminuíram consideravelmente, sendo que dos 19 a 24 meses aconteceram 17 casos (11,2%), dos 25 a 30 meses outros 11 casos (7,3%) e dos 31 a 36 meses aconteceram 7 casos (4,6%).

Somadas o número de amostras positivas de crianças de faixas etárias até 18 meses, foi encontrado um montante de 76,9% de amostras positivas. Dado semelhante ao encontrado por Andreasi et al. (2007) em Mato Grosso do Sul, que estudando crianças com rotavírus de até 3 anos observou que 78,6% das amostras positivas eram de as crianças de até 24 meses.

O gráfico 3 mostra o número de amostras positivas e negativas conforme a faixa etária, nas quais foram encontradas e o gráfico 4 apresenta a porcentagem de casos positivos para rotavírus conforme a faixa etária.

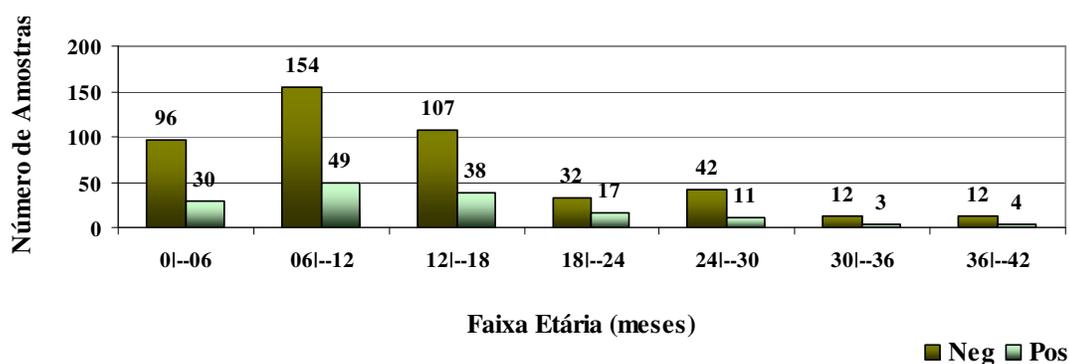


Gráfico 3 – Distribuição do número de amostras positivas e negativas para rotavírus humano em amostras de fezes diarréicas coletadas em Manaus-AM, de crianças de 1 a 36 meses.

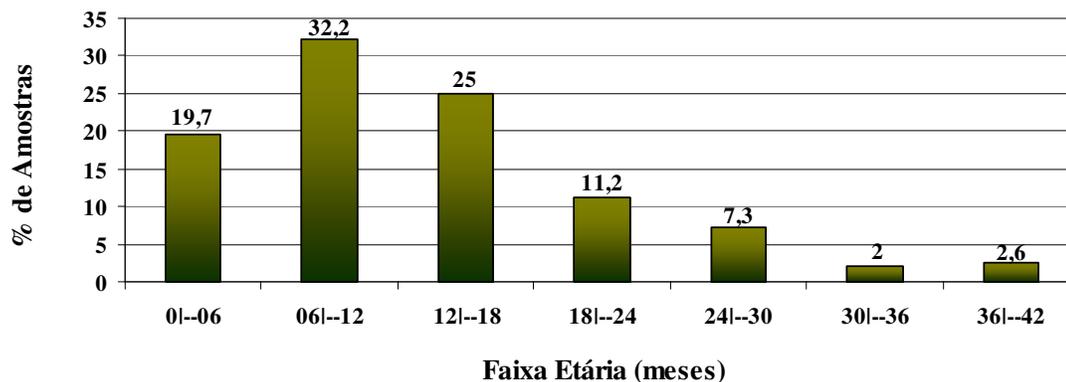


Gráfico 4 – Porcentagem de amostras positivas para rotavírus humano em crianças de 1 a 36 meses divididas por faixa etária em Manaus-AM.

As amostras positivas para rotavírus foram analisadas considerando-se o mês de sua ocorrência, assim, pôde-se perceber que julho, agosto e novembro de 2004 e dezembro de 2005 foram os meses que apresentaram o maior número de amostras positivas, com 12 casos em agosto de 2004 (7,9%) e 10 casos cada um dos demais meses citados (6,6%). Outros meses que se destacaram foram março e setembro de 2005, com 9 casos cada mês (5,9%) e outubro de 2004 com 8 amostras (5,3%), nos demais períodos manteve-se uma variação de 1 a 7 casos. Avaliou-se, assim, que o pico de casos positivos ocorreu no período de julho a novembro de 2004, período que totalizou 42 casos referentes a 27,6% do total geral de amostras positivas. Pode-se visualizar a distribuição de amostras positivas e o mês de sua ocorrência no gráfico 5.

A sazonalidade de rotavírus no norte e nordeste do país é semelhante ao encontrado em países de clima tropical, onde a ocorrência de casos positivos acontece durante todos os meses do ano, diferente do que acontece em estados da região central e sudeste, onde os casos predominam nos meses mais secos ou frios do ano. Rocha em 2003, estudando a clínica e a epidemiologia de doença diarréica por rotavírus em crianças de Manaus, verificou uma

elevação de casos nos meses de maio, setembro, novembro e dezembro de 2002 e fevereiro de 2003, não demonstrado com isso se há um período onde ocorrem mais ou menos casos da doença (ROCHA, 2003).



Gráfico 5 – Amostras de fezes positivas para rotavírus humano distribuídas conforme o mês de ocorrência no período de julho de 2004 a dezembro de 2006 em Manaus-AM.

A distribuição das amostras positivas por zonas do município de Manaus-AM, mostra que 60 casos (39,4%) ocorreram na zona leste da cidade, 29 (19,1%) aconteceram na zona oeste e outros 21 (13,8%) e 20 (13,2%) foram encontrados nas zonas norte e sul consecutivamente. As zonas centro-sul, centro-oeste e interior do estado aparecem com menor número de casos.

Rocha (2003), observou distribuição semelhante a encontrada neste estudo, a autora demonstrou, na época, que 30,8% dos casos positivos para rotavírus ocorreram na zona leste da cidade. Também Costa (2006 - dados não publicados), encontrou a mesma distribuição quando estudava a ocorrência de rotavírus em Manaus, nesse caso o autor observou que 31% dos casos ocorreram na zona leste da cidade. A zona leste atualmente é setor com maior número de domicílios da cidade de Manaus, o aumento do número de moradias na região teve

início a partir do ano 2000, com a abertura de um importante eixo de circulação para a Zona Leste pela Avenida Grande Circular, que contribuiu para a continuação das ocupações espontâneas e o adensamento urbano da área. Apesar desta característica a zona leste é também a que tem a maior número de moradores por domicílio e onde se encontra a menor número de pessoas que vivem em domicílios com banheiro e água tratada (OLIVEIRA; COSTA, 2007).

O fato de essa zona ser uma das mais carentes em sentido de saneamento básico e a mais numerosa em população, pode ser uma das possíveis causas da ocorrência de um número maior de casos positivos de rotavírus no local. Porém outros estudos devem ser realizados na área para que se possa afirmar que estes fatores contribuem como possíveis causas da elevação da doença diarréica por rotavírus nessa zona de Manaus. O número de amostras positivas e negativas e a sua distribuição pelas zonas de Manaus podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4

Distribuição do número e porcentagem de amostras positivas e negativas para rotavírus humano por zona de Manaus, AM.

Amostras positivas e negativas para rotavírus humano distribuídas por zonas de Manaus.				
Zona Geográfica	Amostras			
	Negativas	%	Positivas	%
Norte	71	15,6	21	13,8
Sul	102	22,5	20	13,2
Leste	157	34,5	60	39,4
Oeste	77	16,9	29	19,1
Centro Oeste	6	1,3	6	3,9
Centro Sul	19	4,2	9	5,9
Interior	21	4,6	7	4,7
Outros Estados	2	0,4	0	0,0
Total	455	100,0	152	100,0

Avaliou-se a positividade para rotavírus em relação ao número de episódios de diarreia por criança por dia e com isso obtivemos um total 1528 episódios de diarreia, o que gerou uma média de 10 episódios/criança/dia, com um desvio padrão de 4,1 episódio/criança/dia, a mediana também apresenta um valor de 10 episódios de diarreia por criança por dia.

Rocha (2003), ao avaliar os aspectos clínicos e epidemiológicos da doença diarreica por rotavírus em Manaus, encontrou uma média de episódios de diarreia dia de 7,7 episódios de diarreia por criança por dia.

Ao se observar este dado, inicialmente se imaginou que as crianças com doença diarreica por rotavírus apresentavam um número elevado de episódios de diarreia por dia, porém quando analisados comparativamente o número de episódios de diarreia em crianças com amostras positivas para o rotavírus com amostras negativas para o vírus, percebeu-se que as crianças com amostras negativas para o vírus apresentavam número de episódios de diarreia semelhante às com amostras positivas, no caso as crianças com amostras negativas tiveram uma média de 9,8 episódios/criança/dia, com um desvio padrão de 4,2 episódio/criança/dia, enquanto as crianças com amostras positivas apresentaram em média 10 episódios por dia, com um desvio padrão de 4,1 episódio/criança/dia. A distribuição do número de episódios de diarreia por dia nas amostras positivas está ilustrada no gráfico 6.

Também foi verificado qual era o aspecto das fezes apresentadas pelas crianças com amostras positivas para rotavírus e percebeu-se que as fezes de aspecto líquidas estavam presentes em 131 (86,2%) das 152 amostras positivas. As fezes de aspecto semi-líquidas, pastosas e semi-pastosas e com a presença de sangue e muco também apareceram, porém em quantidade reduzida de amostras.

Em estudo realizado por Rocha em 2003 na cidade de Manaus, a autora constatou que 88,5% das amostras de fezes positivas para rotavírus tinham aspecto de fezes líquidas (ROCHA, 2003).

Neste estudo, assim com em Rocha (2003), foi observado que o aspecto líquido foi o mais encontrado, caracterizando que os dados encontrados, estão de acordo com a literatura atual, onde é relatado que as fezes líquidas é um dos aspectos clínicos mais comuns da doença diarréica por rotavírus (VRANJAC, 2004). O número de amostras negativas e positivas para rotavírus humano em Manaus, conforme o aspecto das fezes esta demonstrado no gráfico 7.

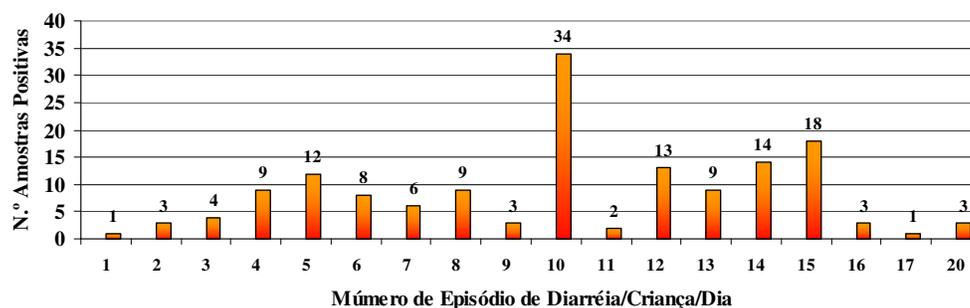


Gráfico 6 – Número de episódios de diarreia apresentados por crianças com amostras positivas rotavírus humano em Manaus, AM.

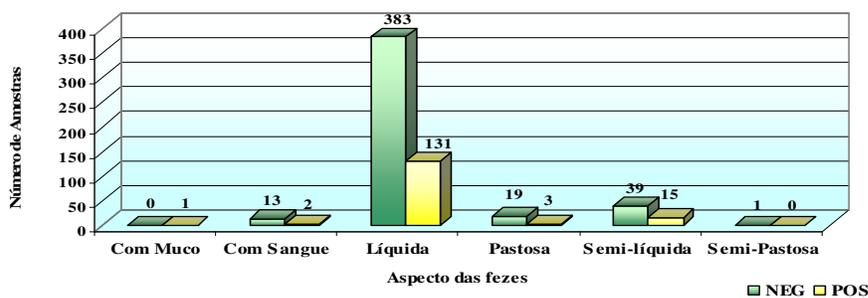


Gráfico 7 – Aspecto das fezes de crianças com amostras positivas e negativas para rotavírus humano em Manaus, AM.

Foram avaliados os principais sinais e sintomas da doença diarréica por rotavírus apresentados pelas crianças com amostras positivas para rotavírus, e percebeu-se que o vômito esteve presente em 133 das 152 crianças com amostras positivas para o vírus (87,5%), percebeu-se também que 123 crianças apresentaram quadro de desidratação (80,9%) e que 108 crianças referiram sintomas característicos de dores abdominais (71,1%). Já a hipertermia foi citada por um número menor de vezes, sendo que 74 mães ou responsáveis referiram a presença do sinal (48,7%).

A hipertermia, o vômito e a desidratação são considerados os principais sinais e sintomas apresentados por crianças com doença diarréica provocada pelo rotavírus (MANRIQUE-ABRIL et al., 2006).

Os achados deste estudo confirmam o que outros autores têm apresentado em estudos realizados no Brasil e no mundo, Carneiro et al. (2005), estudando os aspectos clínicos e epidemiológicos de crianças com gastroenterites por rotavírus em Salvador-Bahia, verificaram que 95,4% das crianças com amostras positivas para o vírus apresentaram vômito, nesse mesmo estudo foi observado que 86% das crianças apresentaram sinais de desidratação. Estudos realizados no Chile mostram dados semelhantes aos encontrados no Brasil, em estudo onde foi avaliado o impacto das gastroenterites por rotavírus em crianças chilenas menores de 3 anos os sinais de desidratação e vômito foram encontrados consecutivamente em 89% e 95% das crianças com amostras positivas para rotavírus (VERGARA et al., 2007).

No caso da hipertermia, estudos mostram que este sinal pode apresentar valores diferentes, dependendo dos locais onde estes estudos são realizados. Nakagomi et al. (2008), quando comparava a severidade da doença por norovírus com a doença diarréica por rotavírus em Recife no Pernambuco, constatou que 88,9% das crianças com rotavírus apresentaram hipertermia. Este dado foi superior ao encontrado por Rocha (2003), que detectou o sinal da doença em 69,9% das crianças avaliadas em estudo sobre os aspectos clínicos e

epidemiológicos da doença diarreica por rotavírus em Manaus-AM. Orlandi et al. (2001) em estudo sobre a ocorrência de rotavírus em Porto Velho, Rondônia verificaram que 60% das crianças com amostras positivas para o vírus.

Os dados apresentados neste trabalho demonstram que a hipertermia, apesar de sempre estar presente em estudo sobre os aspectos clínicos da doença, pode apresentar dados diferentes entre estudos, como foi o caso do achado neste estudo, onde foi observado que 48,7% crianças com amostras positivas para rotavírus apresentaram hipertermia. A porcentagem de crianças com amostras positivas para rotavírus que apresentaram desidratação, vômito, hipertermia e dores abdominais estão demonstrados no gráfico 8.

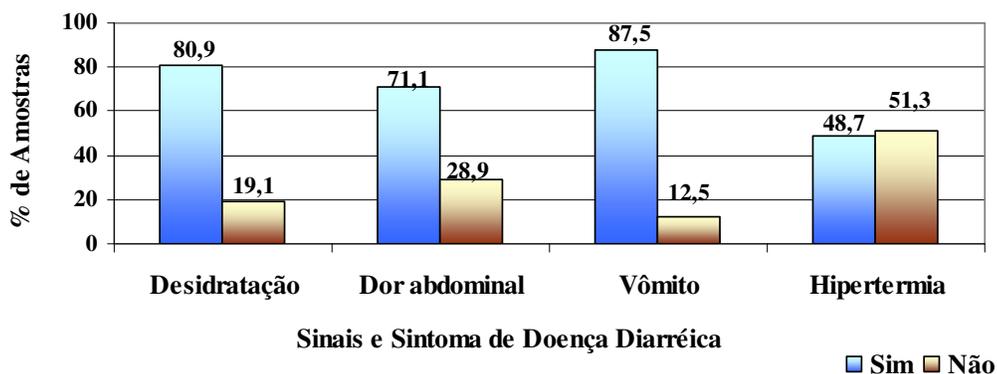


Gráfico 8 – Presença de sinais e sintomas característicos da doença diarreica em crianças com amostras de fezes positivas para rotavírus humano em Manaus, AM.

Foi verificada também a existência de animais domésticos (cães, gatos e outros) e de galinhas nas residências de crianças com amostras de fezes positivas para o rotavírus. Cento e quarenta e sete das cento e cinquenta e duas mães ou responsáveis por crianças com amostras positivas responderam sobre a existência ou não de animais domésticos na residência, outras

146 mães ou responsáveis, responderam sobre a existência de galinhas. Nesta avaliação pode-se perceber que na residência de 73 crianças (49,7%) que tiveram suas amostras positivas para o rotavírus, existiam animais domésticos. Quanto à existência de galinhas verificou-se que esta ave não estava presente em 134 (91,8%) das residências das crianças com amostras positivas para rotavírus.

Nos estudos encontrados, a avaliação da existência de animais domésticos e de galinhas nos domicílios de crianças com doenças diarreicas por rotavírus, é um dado pouco relacionado à positividade para rotavírus, porém este dado pode subsidiar outros estudos que busquem explicações para os casos de pesquisas para rotavírus humano que venham a apresentar negatividade para os genótipos G e P humano mais conhecidos.

Estudos demonstram que um dos fatores que pode levar ao surgimento de novos gens de rotavírus, é a habilidade que este vírus tem de se reorganizar geneticamente durante co-infecções resultantes de troca de material genético entre genótipos de rotavírus humanos e animais (RAMINI; KANG, 2007). A existência de animais domésticos na residência de crianças com amostras positivas para rotavírus está demonstrada nos gráficos 9.

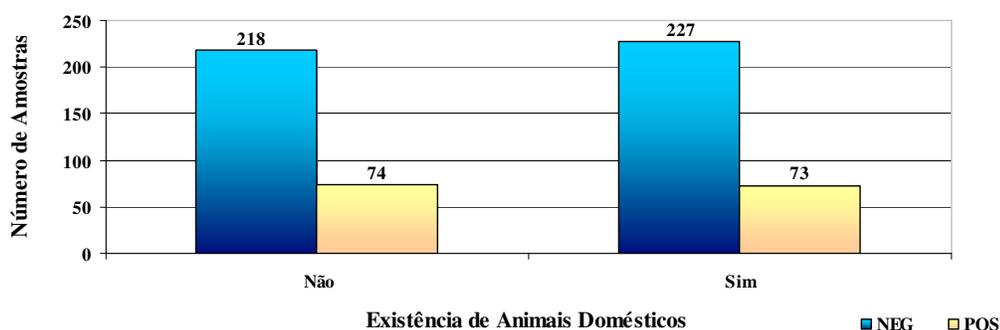


Gráfico 9 – Distribuição da existência de animais domésticos em residências de crianças com amostras positivas e negativas para rotavírus humano em Manaus, AM.

4.2. Positividade para os genótipos P e G de rotavírus humano

Das 152 amostras positivas para rotavírus, 100% foram genotipadas por meio do método de RT-PCR para os genótipos P (VP4) e G (VP7). Na análise dos resultados da genotipagem de 152 amostras, 75 amostras (49,3%) apresentaram características de genótipos G ou P ou ainda combinações dos genótipos P e G e 77 (50,7%) amostras não apresentaram características de nenhum dos dois genótipos pesquisados.

Na análise das 75 amostras positivas para os genótipos P ou G, percebeu-se que a ocorrência de combinações dos dois genótipos aconteceu em 40 amostras (53,3%). Nesta análise, observou-se que 28 amostras (37,3%) apresentaram características somente do genótipo P e 07 amostras (9,3%) somente do genótipo G, com isso somando-se as amostras com características de um único genótipo e as que apresentaram combinações dos genótipos P e G, pode-se concluir que, das 152 amostras positivas para rotavírus, 68 (44,7%) apresentaram características do genótipo P e 47 amostras (30,7%) do genótipo G.

A técnica de RT-PCR é empregada no mundo inteiro, com a finalidade de genotipar o rotavírus do grupo A. A utilização dessa metodologia tem permitido a identificação dos grupos G e P em diversos estudos no Brasil e no mundo.

Costa et al. (2004a), através da utilização desse método pôde traçar o perfil molecular de amostras de fezes positivas para rotavírus em crianças de Goiânia em Goiás, neste estudo, o autor constatou que 79,2% das amostras apresentavam características do genótipo G, enquanto 50,6% apresentavam características de genótipo P. Também Das et al. (2002), na Índia, identificaram como genótipos P ou G 60 % (159/266) das amostras positivas para rotavírus do tipo A, sendo que das 159 amostras 87% eram do genótipo P e 82% eram do genótipo G, nesse estudo Das afirma que 40% das amostras positivas não apresentaram características nem para o genótipo G, nem para o genótipo P.

Neste estudo utilizaram-se os primers Con2 e Con3 para amplificação do gene 4 e os primers Beg9 e End9 para amplificar o gene 9, com esta metodologia, observou-se que 75 amostras (49,3%) apresentaram características para G ou P, porém pouco mais da metade (77 amostras), apesar da positividade para o rotavírus, não foram identificadas nem como genótipo G, nem como genótipo P. O fato destas amostras não terem apresentado características dos genótipos G ou P pode representar a existência de novos grupos ou subgrupos, porém para que essa afirmativa seja considerada são necessários estudos mais detalhados, onde sejam empregados primers que possam identificar genes de rotavírus incomuns. A análise das amostras negativas e positivas para os genótipos P e G pode ser observada na tabela 5, e número de amostras positivas e de combinações para estes dois genótipos pode ser visualizada no gráfico 10.

Tabela 5

Positividade e negatividade para os genótipos P e G em amostras de fezes diarréicas de crianças e 1 a 36 meses, em Manaus, AM.

Amostras positivas e negativas para genótipos P e G				
		Genótipo G		
		Negativas	Positivas	Total
Genótipo P	Negativas	77	7	84
	Positivas	28	40	68
	Total	105	47	152

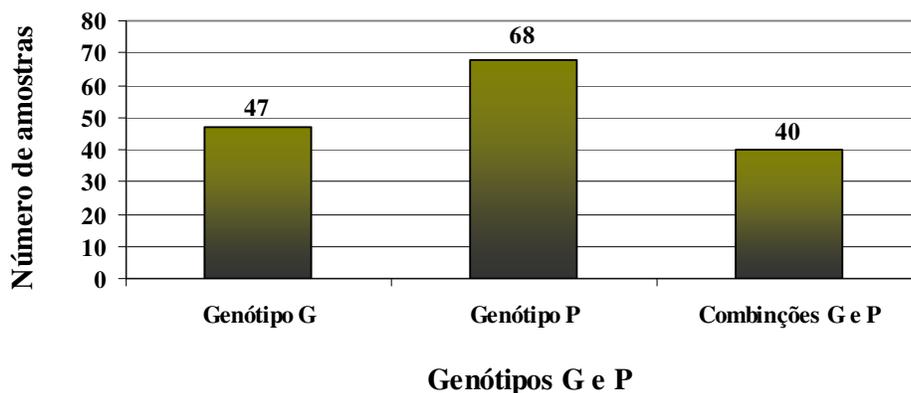


Gráfico 10 – Distribuição da positividade para os genótipos P e G e das combinações P e G em amostras de fezes positivas para rotavírus humano de crianças de 01 a 36 meses em Manaus, AM.

Das 47 amostras positivas para o genótipo G, observou-se que 18 (38,3%) não apresentaram características de nenhum dos genótipos G pesquisados no estudo, sendo que destas 18 amostras, 7 apresentaram o produto da primeira amplificação (determinação de VP7).

O fato destas amostras não ter apresentado característica de nenhum dos 5 genótipos G pesquisados, levanta a suspeita de que, na região, pode estar acontecendo a circulação de genótipos incomuns, como por exemplo, o genótipo G5 , que já foi encontrado no Piauí (MACEDO et al., 2007) e no Pará (MASCARENHAS et al., 2002) ou G8 que foi encontrado em Minas Gerais (SILVA et al., 2002).

Nas demais amostras positivas para o genótipo G ocorreu uma maior frequência dos genótipos G2 que apareceu em 8 amostras (17%), seguidos de G1, com 7 amostras (14,9%), G9 que foram encontrados em 5 amostras (10,6%) e G3 em 2 Amostras (4,3%). Foram

encontradas ainda misturas dos genótipos de G1-G9 em 6 amostras (12,8%), e G1-G3 em uma amostra (2,1%).

Surpreendentemente não foi encontrada nenhuma amostra com características do genótipo G4, apesar deste ser considerado um dos genótipos G mais comumente encontrado em todo o mundo (AHMED et al., 2006).

Conhecidamente, os genótipos G, encontrados com maior prevalência em estudos realizados no planeta, são os genótipos G1 e G4, porém outros genótipos G, como G5, G6, G8, G9 e G10 vêm apresentando significativa importância em vários estudos desenvolvidos, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil (MASCARENHAS et al., 2002).

Neste estudo foram utilizados os primers específicos (Beg9, End9, aBT1, aCT2, aDT4, aET3 e aFT9) capazes de identificação dos genótipos G1, G2, G3, G4 e G9, sendo que o G2 foi encontrado em 17% das amostras, número superior a G1 (14,9%), que normalmente nos estudos aparece com números superiores ao G2 (LUZ et al., 2005; DAS et al., 2002).

Apesar de estudos caracterizarem o genótipo G2 como incomum, este genótipo vem sendo encontrado com certa frequência no Brasil e em outros países, Santos et al. (2003), observaram uma frequência de 22% deste genótipo em amostras de fezes positivas para rotavírus no Rio de Janeiro, Brasil. Também Mascarenhas et al. (2002), detectando os genótipos P e G de crianças de Belém no estado do Pará, encontraram 20% das amostras de genótipo G, com características de G2. O genótipo G2 aparece ainda em estudos realizados em diversos países, como Irlanda (O'MAHONY et al., 1999), Nepal (UCHIDA et al., 2006), Iraque (AHMED et al., 2006) e Chile (VERGARA et al., 2007). O genótipo G9 que, neste estudo, foi encontrado em 10,6% das amostras também tem sido encontrado em estudos no Brasil. Costa et al. (2004a), encontraram em Goiânia, Goiás uma frequência de G9 em 34% das amostras de genótipo G positivas.

O genótipo G9, atualmente é o 4º mais encontrado em humanos (SANTOS et al., 2005), devendo ser considerado de importância epidemiológica para estudos de novas vacinas para rotavírus (ARAUJO et al., 2001).

No gráfico 11 pode-se observar a distribuição das proporções de amostras positivas para os genótipos G.

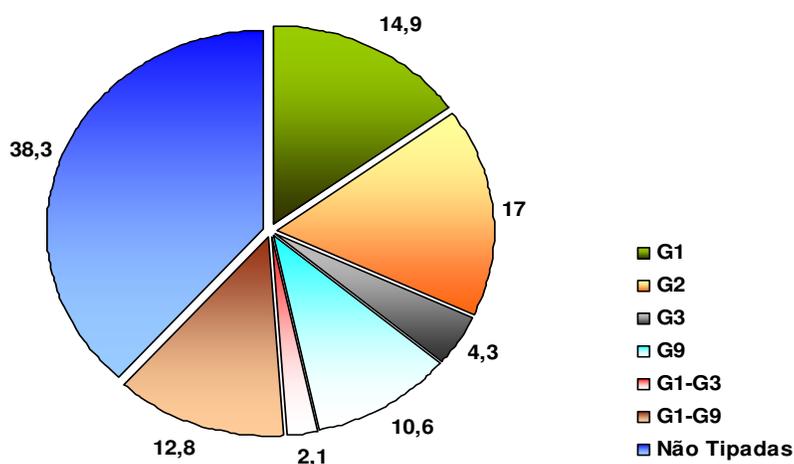


Gráfico 11 – Distribuição das proporções de amostras de fezes positivas para o genótipo G em Manaus, AM.

Quanto aos genótipos P, verificou-se que das 68 amostras positivas, o genótipo P[8] foi observado em 45 (66,2%) e o genótipo P[4] em 9 amostras (13,2%). Os genótipos P[9], P[6] e P[10] foram encontrados cada um uma única vez (1,5%). As misturas de genótipos P[4]-P[6] apareceram 1 vez (1,5%) e P4-P10 apareceram 2 vezes (2,9%).

Foi observado ainda que 8 amostras (11,7%) não apresentaram características de nenhum dos genótipos P pesquisados, sendo que 4 destas amostras que não foram caracterizadas apresentaram o produto da primeira amplificação (determinação de VP4).

Os genótipos P[8], P[4], P[6] e P[9] são conhecidamente os genótipos P mais encontrados em estudos no Brasil e no mundo (MASCARENHAS et al., 2002). O fato de neste estudo os genótipos P[8] terem sido responsáveis por 66,2%, com 13,2% de amostras características de P[4], demonstra que o perfil circulante na região estudada é semelhante aos encontrados em outros estados e países (UNICOMB et al., 1999; O'MAHONY et al., 1999; MOYO et al., 2007; COSTA et al., 2004a, SANTOS et al., 2003). A distribuição dos genótipos P pode ser visualizada no gráfico 12.

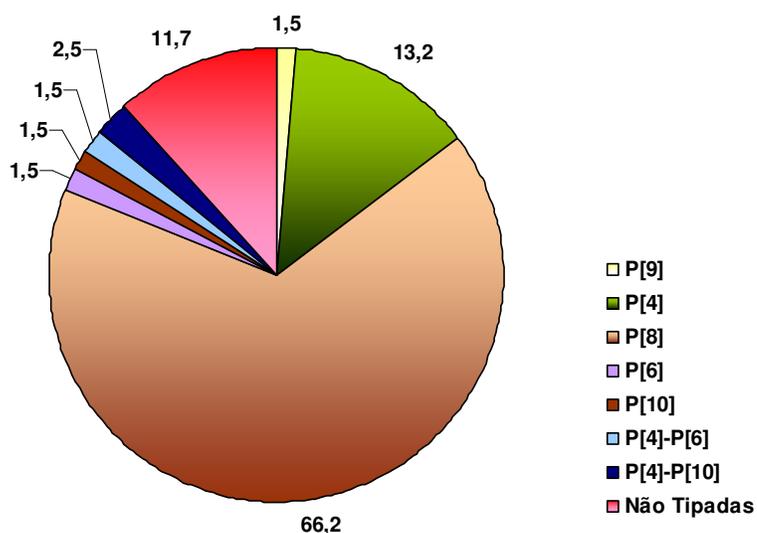


Gráfico 12 – Distribuição das proporções de amostras de fezes positivas para o genótipo G em Manaus, AM.

As combinações dos genótipos G e P foram responsáveis por 40 das 75 amostras positivas para G e P (53,3%). Estas combinações foram analisadas e foi possível verificar que a P[8]G1 estava presente em 5 amostras, o equivalente a 12,3% do total das combinações, foi observado, ainda, que 4 amostras apresentavam combinações de P[4]G2 (10%), P[8]G2 apareceu 3 vezes (7,5%), e a combinação P[8]G3 aconteceu em 2 amostras (5%). As

combinações P[9]G2, P[4]G1, P[8]G9 e P[10]G1, aconteceram cada uma separadamente, em no mínimo uma amostra.

Combinações de genótipos P com a mistura de genótipos G também foram encontradas, sendo que combinação P[8]G1-G9 apareceram em 4 amostras (10%), a combinação de P[6]G1-G9 foi observada em uma amostra (2,5%) e em outra amostra aconteceu a combinação P[4]G1-G3 (2,5%).

Observou-se também que algumas combinações aconteceram entre amostras que não foram caracterizadas para os genótipos P ou G pesquisados. Quatro amostras, que representam 10% das combinações, apresentaram um perfil de combinação onde nem os genótipos P, nem o genótipo G foram caracterizados entre os genótipos P e G pesquisados.

O Genótipo P[8] apareceu em 5 amostras (12,5%) em combinações com genótipos G não tipados, este mesmo fato ocorreu com 2 casos de P[4] (5%), 2 casos das misturas de P[4]-P[10] (5%) e um caso da mistura de P[4]-P[6] (2,5%).

Mundialmente, quatro combinações de genótipos P e G são consideradas de maior importância epidemiológica, estas combinações são P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 e P[8]G4 (BANYAI et al., 2004; SILVA et al., 2002), porém algumas combinações como P[8]G9 e P[6]G9, começam a aparecer em destaque em estudos desenvolvidos no mundo inteiro, inclusive no Brasil (SERAVALLE et al., 2007).

Dos 4 tipos mais comuns de combinações, três foram encontradas neste estudo, P[8]G1 que foi responsável por 12,5% das combinações, P[4]G2 que esteve presente em 05 das combinações (10%) e P[8]G3 que apareceu em 2 combinações (5%).

O P[8]G1 é considerada a combinação de maior importância epidemiológica nas causas da doença diarreica por rotavírus, fato que levou o desenvolvimento de uma vacina monovalente que confere imunidade para esta combinação. Estudos realizados em estados brasileiros como Recife (MONTENEGRO et al., 2007), Mato Grosso do Sul (ANDREASI et

al., 2007) e Rio de Janeiro (SANTOS et al., 2003) e no Distrito Federal (LEITE et al., 1996), bem como, em outros países, como França (BOM et al., 2000), Irlanda (O'MAHONY et al., 1999), Nepal (UCHIDA et al., 2006) e USA (RAMACHANCHAN et al., 1998a), mostram que a combinação P[8]G1 é predominante tanto no Brasil, como no mundo.

As combinações P[4]G2 e P[8]G3 também aparecem em destaque em estudos realizados no Brasil, bem como em outros países (ARAUJO et al., 2001; DAS et al., 2002; MOTA-HERNANDES et al., 2003; PHAN et al., 2007; LAIRD et al., 2003).

Foi encontrada uma amostra com a combinação P[8]G9 (2,5%), esta combinação, até pouco tempo, era considerada incomum, atualmente esta combinação vem merecendo destaque em várias publicações (SERAVALLE et al., 2007). Santos et al. (2005), estudando a doença por rotavírus em crianças de Salvador-Bahia, encontrou esta combinação em 74,5% das amostras, Já Montenegro et al. (2007) estudando a doença diarréica por rotavírus no Recife-Pernambuco, encontrou a combinação P[8]G9 em 29% das amostras, número menor do que o encontrado por Santos et al. (2005), porém não menos expressivo. A combinação P[8]G9 foi encontrada também em estudos realizados no Rio de Janeiro (SANTOS et al., 2003) e em Goiás (COSTA et al., 2004a) e em outros países como Japão (PHAN et al., 2007) Iraque (AHMED et al., 2006) e na Tanzânia, onde foi responsável por 90,7% (39/43) das amostras positivas para rotavírus (MOYO et al., 2007).

Combinações incomuns como P[4]G1 foram encontradas por Silva et al (2002), que estudando amostras de fezes positivas para rotavírus em Juiz de Fora-Minas Gerais, encontrou esta combinação em 15% das amostras.

Neste estudo, foram encontradas duas amostras contendo combinações incomuns, uma foi caracterizada como P[9]G2 e outra P[10]G1, que não foram encontradas em nenhum outro estudo conhecido até o momento. Um estudo para caracterização molecular dos rotavírus humano e animal em países da Europa, encontrou uma amostra caracterizada como genótipo

P[9] em combinação com o genótipo G1 (HEIDE et al., 2005), em um estudo realizado em Dar, na Tanzânia, para caracterização dos rotavírus tipo A, foram utilizados primers específicos para identificação tanto do genótipo P[9] quanto do genótipo P[10], porém nenhum dos genótipos foram encontrados (MOYO et al., 2007). No Brasil, Macedo (2007), também utilizou primers para identificação destes genótipos, sendo que a autora encontrou 4,9% de amostras positivas para P[10] e nenhuma para P[9] (MACEDO et al., 2007).

A combinação de P[6] com a mistura dos genótipos G1-G9, não aparecem normalmente em outros trabalhos, porém as combinações de P[6]G1 e P[6]G9 podem ser consequência da combinação do genótipo P[6] com co-infecção pelos genótipos G1 e G9, que, separadamente, são comumente encontradas no Brasil. A combinação P[6]G1 foi encontrada em Goiás (COSTA et al., 2004a), em Minas Gerais (SILVA et al., 2002) e no Pará (MASCARENHAS et al., 2002). P[6]G9, por sua vez, foi encontrado em estudos no Rio de Janeiro (ARAUJO et al., 2001; SANTOS et al., 2003).

P[4] foi outro genótipo P que só foi encontrado em combinação com a mistura de G1-G3, que como no caso citado, pode resultar da combinação de co-infecção pelo genótipo G1 e genótipo G3 em combinação com o genótipo P[4], da mesma forma que no caso anterior, estas combinações, apesar de incomuns, quando separadas, são encontradas em estudos no Brasil; Silva et al. (2002), em Minas Gerais, encontrou 60% das amostras positivas para rotavírus com características de G3, sendo que a maioria delas apresentava combinações com P[4].

Surpreendentemente foi constatado que 40% (16 amostras) das combinações encontradas neste estudo foram caracterizadas como combinações de genótipos P[4] ou P[8] e das misturas de P[4]P[10] ou P[4]P[6] com os genótipos G não tipados e de G9 em combinação de genótipos P não tipados (5%). Outro caso foi de 4 combinações que

apresentaram características negativas tanto para os genótipos G quanto para os P pesquisados (10%).

O número elevado deste tipo de combinação pode ser um indicativo da circulação na região de genótipos P e, principalmente, de genótipos G, que começaram a ser encontrados em estudos mais recentes. Um desses genótipos é o G5 que foi encontrado no Piauí (MACEDO et al., 2007) e no Pará (MASCARENHAS et al., 2002). Outro Genótipo G que pode ser citado aqui são os G8 e G10 que foram encontrados no Rio de Janeiro (SANTOS et al., 1998). Outros genótipos G e P estão sendo apresentados em estudo realizados em outros países, como no Nepal, onde em estudo para caracterização molecular do rotavírus em amostras de fezes de crianças e adultos foram encontrados os genótipos G do tipo G11 e G12 e o genótipo P[25], sendo que este último foi encontrado como a combinação P[25]G11 (UCHIDA et al., 2006).

Os dados encontrados nesses estudos demonstram que muitos genótipos que anteriormente eram tidos como restritos a animais, como G5, que são geralmente isolado em porcos ou G6, G8 e G10 que, primeiramente, foram isolados em bovinos (LAIRD et al., 2003) podem estar sendo transmitidos de animais para humanos, ou como vírus inteiros ou como reorganização de segmentos de genes.

O fato do número elevado de amostras positivas para rotavírus humano apresentar combinações com os genótipos P ou G não tipadas, demonstra que estudos, utilizando primers para os genótipos G e para os genótipos P mais recentes, devem ser desenvolvidos, com o intuito de se levantar qual a real epidemiologia molecular do rotavírus da região.

A formação de combinações de genótipos P com genótipos G está representada na tabela 6.

Tabela 6

Combinações entre os genótipos G e P em amostras de fezes positivas para rotavírus humano em Manaus, AM.

Combinações de genótipos g e p em amostras positivas para rotavírus humano								
VP4/VP7	G1	G2	G3	G9	G1-G3	G1-G9	Não Tipadas	Total
P[9]		1						1
P[4]	1	4			1		2	8
P[8]	5	3	2	1		4	5	20
P[6]						1		1
P[10]	1							1
P[4]-P[10]							2	2
P[4]-P[6]							1	1
Não Tipadas				2			4	6
Total	7	8	2	3	1	5	14	40

As combinações entre os genótipos G e P foram distribuídas conforme o mês de sua ocorrência e foi possível verificar que estas combinações aconteceram de maneira uniforme durante todo o período da pesquisa, com exceção da combinação P[8]G1, que ocorreu somente até fevereiro de 2006, período em que foi introduzida pelo PNI (Programa Nacional de Imunização), no Calendário Nacional de Vacinação uma vacina monovalente que confere imunidade para a combinação binária P[8]G1, outro fato que chama a atenção é que nesta mesma época (fevereiro de 2006) intensificaram-se os casos de P[4] em combinação com G1, G2 e com misturas de G1+G3. A distribuição das combinações dos Genótipos G e dos genótipos P distribuídos pelo mês de ocorrência pode ser verificada na tabela 7.

Este fato demonstra que com a saída de P[8] de circulação pela introdução da vacina, novas combinações binárias com P[4]G1, que não são comumente encontradas, podem assumir papel de destaque na epidemiologia das doenças diarreicas por rotavírus. Fato semelhante a este foi observado por Gurgel em 2007, quando este estudava crianças vacinadas e não vacinadas contra o rotavírus em Aracajú no estado de Sergipe, verificou que mesmo

após terem recebido a vacina contra rotavírus algumas crianças desenvolveram a doença, o autor observou que todas as crianças que foram vacinadas contra o vírus e posteriormente desenvolveram doença diarréica por rotavírus, apresentaram a combinação P[4]G2 (GURGEL et al., 2007).

Tabela 7

Combinações de genótipos P e G em amostras de fezes coletadas de julho de 2004 a dezembro de 2006, em Manaus, AM.

Mistura de genótipo P e G												
Mês/ Ano	P[9] G2	P[4] G1	P[4] G2	P[4] G1- G3	P[8] G1	P[8] G2	P[8] G3	P[8] G9	P[8] G1- G9	P[6] G1- G9	P[10] G1	Total
Jul/04									1			1
Ago/04	1				1							2
Set/04					1							1
Nov/04									1			1
Dez/04					1							1
Mar/05								1				1
Mai/05					1							1
Set/05			1						2			3
Out/05							1					1
Nov/05						1						1
Dez/05						2						2
Fev/06			1		1		1				1	4
Mar/06		1										1
Abr/06			1									1
Jun/06				1								1
Out/06			1									1
Dez/06										1		1
Total	1	1	4	1	5	3	2	1	4	1	1	24

4.2.1 Características das amostras positivas para o genótipo G de rotavírus humanos

O genótipo G foi analisado levando-se em consideração o sexo das crianças que apresentaram amostras positivas para esse genótipo e percebeu-se que a positividade para rotavírus entre o sexo masculino e feminino foi semelhante. Com exceção do genótipo G9 que

foi encontrado em 4 amostras (8,5%) de crianças do sexo feminino e em 1 (2,1%) em crianças do sexo masculino, os demais genótipos G foram encontrados em igual quantidade tanto em crianças do sexo masculino quanto nas do sexo feminino. Estes dados mostram que o sexo da criança com doença diarreica por rotavírus não influencia na positividade para os genótipos G. A distribuição de genótipos G pelo sexo das crianças com amostras positivas pode ser verificada no gráfico 13.

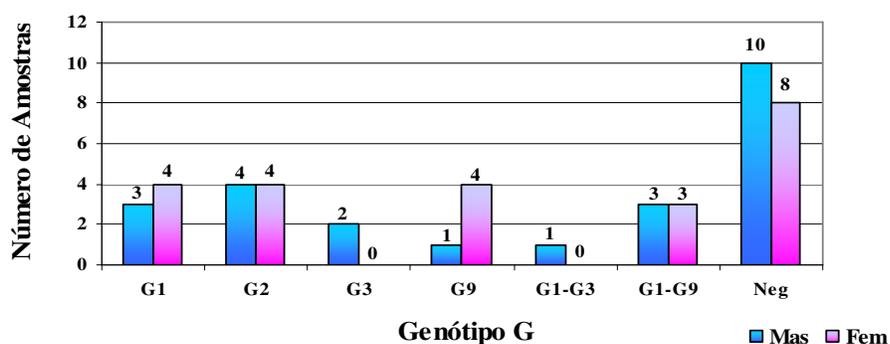


Gráfico 13 – Número de amostras de fezes positivas para o genótipo G conforme o sexo de crianças de 1 a 36 meses em Manaus, AM.

A faixa etária das crianças que tiveram amostras positivas para genótipo G também foi avaliada e com isso pôde-se verificar que os maiores números de casos ocorreram nas faixas etárias de 6 a 12, onde ocorreram 14 casos (29,8%) e na de 12 a 18 meses, onde foram encontrados 13 casos (27,7%), a faixa etária de 0 a 6 meses apareceu na seqüência com 7 amostras (14,9%). As faixas etárias que indicam idade superior a 18 meses aparecem com números que variam de 1 a 5 amostras.

Como já era esperado, a maioria das amostras positivas para o genótipo G foi encontrada em crianças com idade até 18 meses (72,4%). Fischer et al. (2005), avaliando as

características dos rotavírus em população da Dinamarca, verificou fato semelhante, neste estudo foi constatado que 57% das amostras positivas para o genótipo G eram de crianças menores de 2 anos e outras 43% foram encontrados nas demais faixas etárias estudadas na população, que ia de 2 a maiores de 65 anos.

O número de amostras positivas para o genótipo G por faixa etária pode ser visualizado no gráfico 14 e a distribuição dos genótipos G pelas faixas etárias podem ser analisadas na tabela 8.

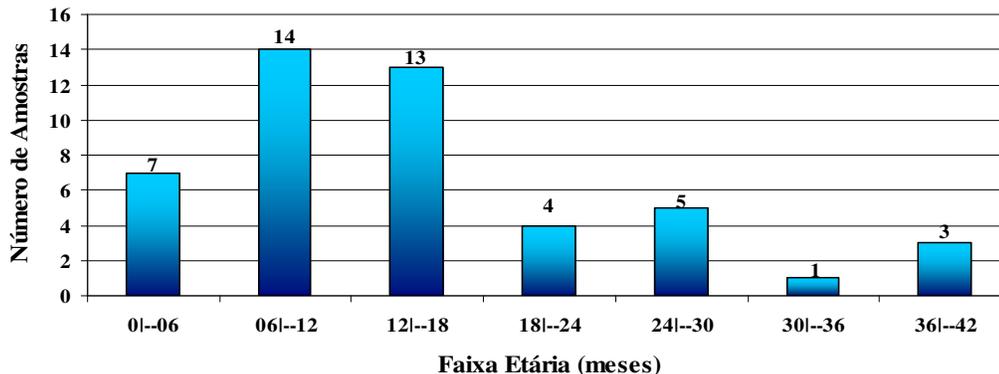


Gráfico 14 – Número de amostras positivas para o genótipo G em crianças de 1 a 36 meses distribuídas por faixa etária em Manaus, AM.

Foram avaliados os meses de ocorrência dos casos de genótipo G e foi verificado que o maior número de casos aconteceu em agosto de 2004, onde aparecem 5 amostras positivas (10,6%). Destacam-se, ainda, os meses março de 2005 e fevereiro de 2006 com 4 casos cada (8,5%), os demais meses apresentam entre 0 e 3 amostras, vale ressaltar que a ocorrência de casos característicos do genótipo G1 aconteceram até março de 2006, época que se iniciaram as campanhas de vacinação contra rotavírus, voltando a acontecer em junho do mesmo ano somente em misturas com G3.

As amostras com características G2 apareceram em 1 amostra em 2004, voltando a acontecer em setembro de 2005. Já os casos de G9 apareceram em 2004 e 2005, voltando a acontecer em mistura com G1 em 2006. Quanto às amostras que não apresentaram características de nenhum dos genótipos G pesquisados, percebeu-se que estas amostras foram encontradas de outubro de 2004 a agosto de 2005, ressurgindo em março de 2006 até a finalização da coleta de dados para este estudo.

Fischer et al. (2000), estudando genótipos de rotavírus em crianças de Guiné-Bissau, África, de janeiro de 1996 a março de 1998, observou a ocorrência de uma diversidade de genótipos, sendo que estes aconteceram com uma frequência que variava de ano para ano. Com base nesse achado, a autora sugeriu na época, que um estudo para a avaliação de uma vacina para determinada região deveria ser estendido por vários anos, tendo em vista que os genótipos podem surgir em períodos específicos.

A distribuição dos genótipos G conforme o mês de sua ocorrência pode ser visualizado na tabela 9.

Tabela 8

Amostras positivas para o genótipo G em crianças de 1 a 36 meses, distribuídas pela faixa etária em Manaus, AM.

Genótipo G								
Faixa Etária	G1	G2	G3	G9	G1-G3	G1-G9	Não Tipadas	Total
01--06	2	2	1	1		1	1	8
06--12		1		1		3	9	14
12--18	3	2			1	1	5	12
18--24		1	1	1			1	4
24--30	2	2					1	5
30--36				1				1
36--42				1			1	3
Total	7	8	2	5	1	6	18	47

Tabela 9

Distribuição da ocorrência de genótipos G por mês de ocorrência em amostras de fezes coletas em Manaus, AM, de Julho de 2004 a dezembro de 2006.

Genótipo G								
Mês/Ano	G1	G2	G3	G9	G1-G3	G1-G9	Não Tipadas	Total
Jul/04				1		1		2
Ago/04	1	1		3				5
Set/04	1							1
Out/04							2	2
Nov/04						1	1	2
Dez/04	1					1	1	3
Fev/05							1	1
Mar/05				1			3	4
Abr/05							1	1
Mai/05	1							1
Ago/05							1	1
Set/05		1				2		3
Out/05			1					1
Nov/05		1						1
Dez/05		2						2
Fev/06	2	1	1					4
Mar/06	1						1	2
Abr/06		1					1	2
Jun/06					1		1	2
Jul/06							1	1
Ago/06							2	2
Set/06							1	1
Out/06		1						1
Dez/06						1	1	2
Total	7	8	2	5	1	6	18	47

Os casos positivos para o genótipo G foram distribuídos pelas zonas da cidade de Manaus e pôde-se averiguar que o maior número de amostras positivas para o genótipo foi encontrado na zona leste da cidade, onde aconteceram 17 casos de genótipo G (36,2%), outras zonas da cidade que se destacaram foram as zonas oeste com 10 casos (21,3%) e a norte com 09 casos (19,1%). As zonas sul, centro-oeste e centro-sul da cidade aparecem com um número

inferior de casos que variam de 2 a 6 casos. As amostras provenientes do interior do estado ou de outros estados não apresentaram positividade para os genótipos G.

Apesar de um grande número de amostras terem sido encontradas na zona leste da cidade, o estudo mostrou que os genótipos G foram encontrados de forma igualitária em todas as zonas da cidade.

Este fato evidencia o que é mostrado em estudos realizados dentro de um espaço territorial limitado, ou seja, mostram que as diferenças na distribuição de determinado genótipo em localidades específicas como municípios e comunidades são mínimas.

Em estudo realizado em Dhaka, Bangladesh, foram coletadas amostras de fezes de crianças de regiões distintas da cidade, essas regiões foram especificadas como regiões norte, nordeste, noroeste e sudeste do município sendo que no estudo foram encontradas pequenas variações na distribuição dos genótipos G pelas regiões chamadas pelo autor de sentinelas (UNICOMB et al., 1999).

O número de amostras positivas para o genótipo G e sua distribuição pelas zonas da cidade de Manaus está representado na tabela 10.

Tabela 10

Amostras positivas para o genótipo G distribuídas pelas zonas da cidade de Manaus, AM.

Genótipos G								
Zona Geográfica	G1	G2	G3	G9	G1-G3	G1-G9	Não Tipadas	Total
Norte	2	1		1		2	3	9
Sul	2					1	3	6
Leste	1	4	2	3		2	5	17
Oeste	2	3		1	1		3	10
Centro-Oeste						1	2	3
Centro-Sul							2	2
Total	7	8	2	5	1	6	18	47

Foi calculada a quantidade de episódios de diarreia por dia apresentadas pelas crianças que tiveram suas amostras de fezes positivas para o genótipo G. Por este calculo, obteve-se um total de 439 episódios de diarreia o que gerou uma média de 9,3 episódios de diarreia por criança por dia com um desvio padrão de 3.8 episódios/criança/dia. Foi verificado que das 47 crianças com amostras positivas para o genótipo G, 27 crianças (57,4%) apresentaram entre 10 e 15 episódios de diarreia por dia e que a única criança com caso positivo com misturas dos genótipos G1 e G3 apresentou 20 episódios de diarreia no dia. As outras duas crianças com amostras positivas para o genótipo G3 apresentaram 10 e 12 episódios de diarreia por dia. Os demais genótipos apresentaram entre 2 e 15 episódios de diarreia por dia. Estes dados podem ser verificados na tabela 11.

Além do número de episódios de diarreia, foi avaliado, ainda, o aspecto das fezes dessa diarreia e notou-se que o relato de aspecto de fezes líquidas estava presente em 39 das 47 amostras positivas para o genótipo G (83%), as outras 8 amostras positivas ficaram divididas entre 7 amostras com aspectos semi-líquido (17,9%) e uma onde houve o relato da presença de sangue (2,1%).

A distribuição pelos genótipos G pelo aspecto das fezes mostrou que 100% das amostras positivas para G1, G3 e G9 apresentaram fezes líquidas, nas 8 amostras positivas para genótipo G2, em 7 (87,5%) as mães ou responsáveis pelas crianças referiram que o aspecto das fezes era líquido e uma (12,5%) referiu que a criança apresentou fezes com aspecto semi-líquido, a mistura dos genótipos G1-G9 também seguiram esse padrão com 5 amostras com aspecto de fezes líquidas (83,3%) e uma com características de fezes semi-líquidas (16,7%). A única amostra onde foi referida a presença de sangue apresentou negatividade para os genótipos G pesquisados.

A distribuição dos genótipos G conforme o aspecto das fezes esta demonstrada na tabela 12.

Tabela 11

Distribuição da quantidade de episódios de diarreia apresentados por crianças com amostras positivas para o genótipo G em Manaus, AM.

Genótipo G								
Episódios de diarreia/dia	G1	G2	G3	G9	G1-G3	G1-G9	Não Tipadas	Total
2		1						1
3				1				1
4	1						2	3
5				1			4	5
6	1	1				1	1	4
7						1	1	2
8		1					2	3
10		1	1	2		3	6	13
12	1	2	1			1	2	7
14	2	2						4
15	2			1				3
20					1			1
Total	7	8	2	5	1	6	18	47

Tabela 12

Aspecto da amostra de fezes diarreicas positivas para o genótipo G apresentadas por crianças de Manaus, AM.

Aspecto das Fezes em Amostras Positivas para Genótipo G						
Aspecto/Genótipo G	Líquidas	Semi-Líquidas	Pastosa	Semi-Pastosa	Presença Sangue	Total
G1	7					7
G2	7	1				8
G3	2					2
G9	5					5
G1-G3		1				1
G1-G9	5	1				6
Não Tipadas	13	4			1	18
Total	39	7	0	0	1	47

Os principais sinais e sintomas característicos da doença diarreica por rotavírus que foram apresentados pelas crianças com amostras positivas para o genótipo G foram avaliados

e constatou-se que 6, das 7 crianças com amostras positivas para G1, apresentaram vômito (85,7%). Com exceção da mistura de genótipos G1-G9 que apresentou a presença de vômito em 3 das 6 amostras positivas (50%), esse perfil seguiu em todos os outros genótipos G, pois relato de vômito aparece também em 6 das 7 amostras positivas para G2 (87,5%), em 14 das 18 negativas (77,8%) e em 100% das amostras G3, G9 e da mistura de G1-G3. O número de amostras onde há referência de vômito e as suas respectivas proporções está distribuído no Gráfico 15.

Quanto à desidratação, estes foram relatados pela maioria dos responsáveis por crianças com amostras positivas para o genótipo G. A desidratação esteve presente em 06 casos de genótipo G1 (85,7%), em 100% dos casos positivos para de G1-G3, em 5 dos 6 casos de G1-G9 (83,6%) e em 7 casos positivos para o genótipo G2 (87,5%). Nas crianças que tiveram amostras negativas para os genótipos pesquisados a desidratação foi relatada em 14 casos (77,8%). Apenas no caso de G9 este sinal de doença diarréica foi mais brando, e mesmo, assim aconteceu em 3 das 5 crianças com amostras positivas para o genótipo (60%). Estes dados podem ser visualizados no gráfico 16.

As dores abdominais aparecem em grande parte das crianças com amostras positivas para os genótipos G, sendo que no genótipo G1 e G3 a presença de dor foi relatada pelos responsáveis de 100% das crianças, já na única amostra da mistura G1-G3 não houve relato de dor abdominal. Quando as amostras apresentaram negatividade para os genótipos G, pesquisados em 7 amostras, havia relatos de dores abdominais (61,1%), a do número de crianças que apresentaram este sintoma e que tiveram suas amostras positivas para o genótipo G pode ser analisada no gráfico 17.

A presença de hipertermia também foi avaliada e esta avaliação mostrou que, com exceção de G1, onde o sinal foi referido por 6 de 7 responsáveis por crianças com amostras positivas para o genótipo (85,7%), nas crianças com amostras positivas para os demais

genótipos G, houve semelhança quanto à presença ou não da hipertermia. Observou-se ainda que nos genótipos G3 e na mistura de G1-G3 a presença de hipertermia foi negada por 100% dos responsáveis pelas crianças. O gráfico 18 representa o número de crianças com amostras positivas para o genótipo G que apresentaram hipertermia.

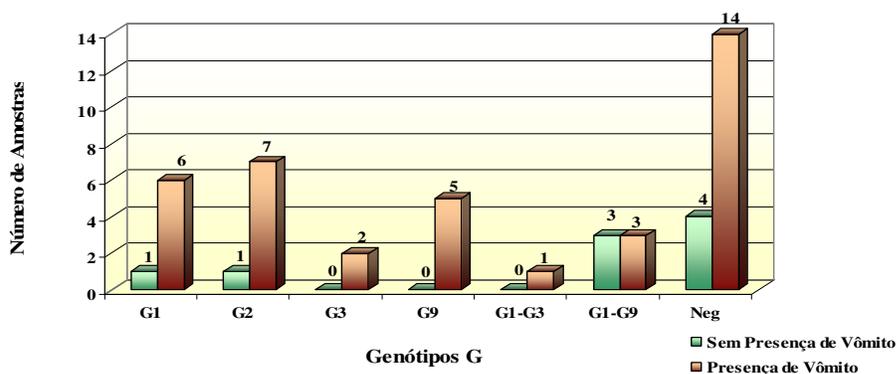


Gráfico 15 – Distribuição da presença de vômito em crianças com amostras positivas para o genótipo G em Manaus, AM.

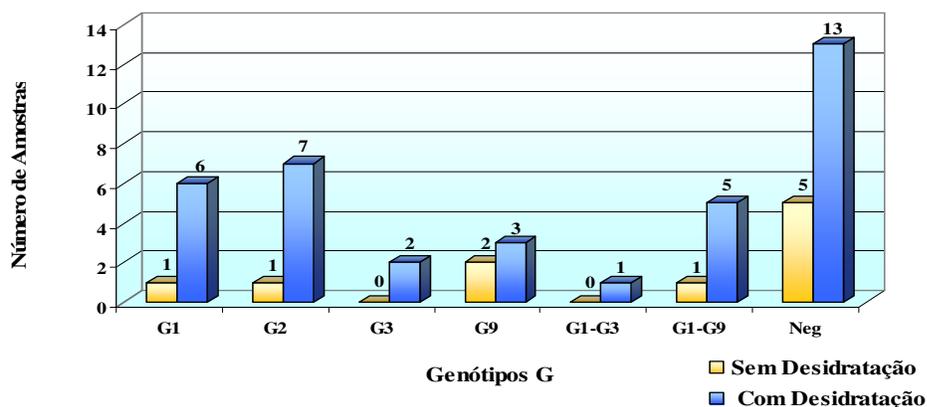


Gráfico 16 – Distribuição da presença de desidratação em crianças com amostras positivas para o genótipo G em Manaus, AM.

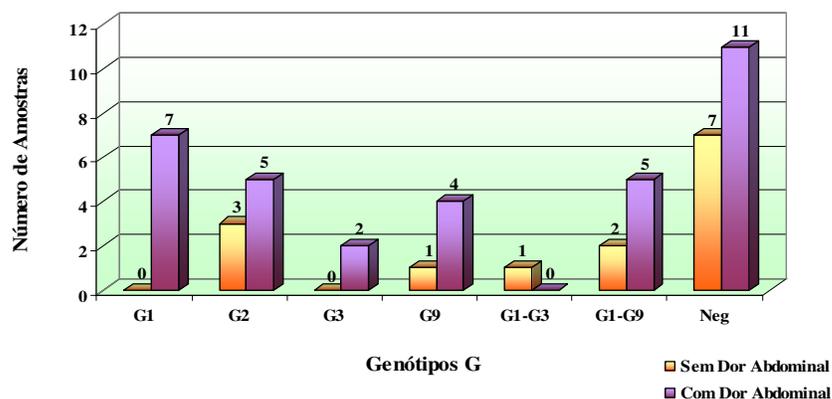


Gráfico 17 – Distribuição da presença de dores abdominais em crianças com amostras positivas para o genótipo G em Manaus, AM.

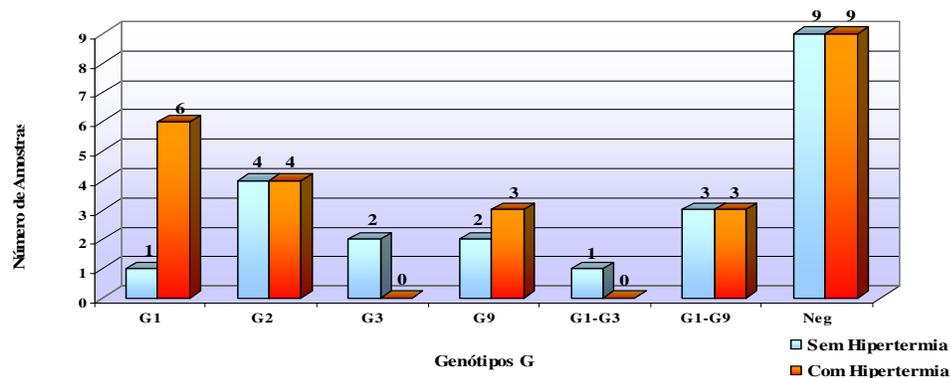


Gráfico 18 – Distribuição da presença de hipertermia em crianças com amostras positivas para o genótipo G em Manaus, AM.

Foram avaliadas ainda as presenças de animais domésticos, como cães e gatos e de galinhas nas residências das crianças que tiveram amostras positivas para o genótipo G, principalmente para se verificar se havia relação entre a presença destes animais e a negatividade para os genótipos pesquisados.

Nesta análise, percebeu-se que em 25 das 47 amostras positivas para o genótipo G (53,2%) a resposta à pergunta sobre a existência de animais domésticos foi negativa, 20 pessoas responsáveis pelas crianças afirmaram existir animais de estimação na casa (42,5%) e outras 2 não souberam responder à questão (4,3%). A existência de animais domésticos na residência de crianças que apresentaram amostras negativas para os genótipos G pesquisados apareceram em 7 casos (38,9%) e em outros 11 casos (61,1%) a resposta foi negativa para a questão. A distribuição dos genótipos G e a existência ou não animais domésticos nas residências de crianças com amostras positivas para o genótipo pode ser avaliado na tabela 13.

Tabela 13

Presença de animais domésticos em residências de crianças com amostras de fezes positivas para o genótipo G.

Existência de animais domésticos em residência de crianças com amostras positivas para os genótipos G			
Genótipos G	Sim	Não	Total
G1	4	2	6
G2	5	3	8
G3	1	1	2
G9	1	3	4
G1-G3	0	1	1
G1-G9	2	4	6
Não Tipadas	7	11	18
Total	20	25	45

Dos 20 casos positivos para o genótipo G onde existiu a resposta afirmativa para a existência de animais de estimação nas residências; em 19, o animal indicado foi o cão (95%), e em uma residência, foi relatada a existência de gato (5%). Das 7 amostras que não apresentaram características de nenhum dos genótipos G pesquisados e que foram constatadas a presença de animais domésticos na residência, em 6 (85,7%) esses animais eram cachorros e

em uma amostra (14,2%) foi relatada a presença de gatos. Este dado pode ser avaliado na tabela 14.

Quanto à existência de galinhas nas residências de crianças com amostras positivas para o genótipo G também foi avaliado e verificou-se que em 44 as 47 amostras positivas não foram citadas a existência desta espécie de ave na residência (93,6%).

Neste estudo foram encontradas 18 amostras que apesar de serem positivas para o genótipo G não apresentaram características de nenhum dos genótipos pesquisados.

Foi verificado se, nas casas onde essas amostras foram encontradas, existiam ou não animais domésticos e constatou-se que em 7 delas esses animais estavam presentes. Estudos demonstram que a convivência com animais como cachorros e porcos pode resultar na transferência de genes do vírus de animais para humanos. Laird et al. (2003) detectou genes VP7 originados de animais em crianças mexicanas, o autor relata que no caso das duas crianças onde os genes foram encontrados, havia uma convivência dessas crianças, com cachorros e porcos.

Tabela 14

Presença de animais domésticos divididos por espécies em residências de crianças com amostras de fezes positivas para o genótipo G.

Espécies de animais existentes em residências de crianças com amostras de fezes positivas para genótipo G					
Genótipos G	Cachorro	Gato	Cachorro e gato	Outros	Total
G1	4	0	0	0	4
G2	5	0	0	0	5
G3	1	0	0	0	1
G9	1	0	0	0	1
G1-G3	0	0	0	0	0
G1-G9	2	0	0	0	2
Não Tipadas	6	1	0	0	7
Total	19	1	0	0	20

4.2.2 Características das amostras positivas para o genótipo P de rotavírus humano

Foi avaliado qual era o sexo das crianças que tiveram amostras de fezes positivas para o genótipo P, e verificou-se uma ligeira elevação dos casos dos genótipos P em crianças do sexo feminino, pois do total de 68 amostras 39 (57,4%) eram do sexo feminino e 29 (42,6%) eram do sexo masculino. No gráfico 19, é possível se verificar que o genótipo P[4] foi encontrado duas vezes mais em crianças do sexo feminino que em crianças do sexo masculino, as amostras negativas para os genótipos P pesquisados, também apresentam esta característica, as amostras caracterizadas como P[8] apresenta uma ligeira elevação de casos também em crianças do sexo feminino.

Fischer et al. (2005) em estudo para caracterização do rotavírus na Dinamarca percebeu fato semelhante ao encontrado neste estudo, o autor verificou que 57% das amostras positivas para os genótipos P e G foram encontradas em crianças de sexo masculino, porém este dado não foi citado pelo autor como relevante para o estudo.

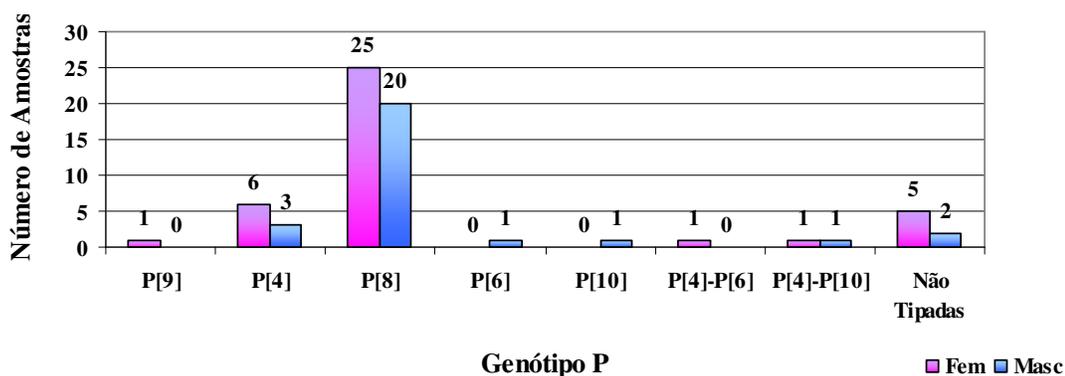


Gráfico 19 – Número de amostras de fezes positivas para o genótipo P conforme o sexo de crianças de 1 a 36 meses em Manaus, AM.

A idade das crianças com amostras positivas para o genótipo P foi analisada e observou-se que a faixa etária predominante foi a de 6 a 12 meses, com 23 casos (33,8%) seguidos das faixas etárias de 12 a 18 e de 1 a 6 meses com 15 (22,1%) e 11 (16,2%) casos respectivamente.

A maioria das crianças com amostras positivas para os genótipos P concentrou-se nas faixas etárias de 0 a 18 meses (85,3%), sendo que das 45 amostras positivas para o genótipo P[8] 38 (84,4%) também foram encontradas nestas faixas etárias.

O número de amostras positivas por faixa etária pode ser visualizado no gráfico 20 e a distribuição dos genótipos G pelas faixas etárias podem ser analisada na tabela 15.

A distribuição das amostras positivas para o genótipo P conforme o mês de ocorrência mostrou que o mês com maior número de casos foi março de 2005, onde ocorreram 7 casos positivos para o genótipo P, sendo que 6 foram caracterizados como P[8] e um não apresentou características de nenhum dos genótipos G pesquisados. Nos demais meses dos anos de 2004 a 2006 percebeu-se uma variação de 0 a 5 casos por mês. Quanto à distribuição dos genótipos P pelos meses de ocorrência, observou-se que os 8 casos não tipados para os genótipos P pesquisados aconteceram até maio de 2005 e que o genótipo P[8] foi encontrado até abril de 2006, época em que se iniciaram as campanhas de vacinação contra o rotavírus no país, verificamos ainda que, nesse mesmo período do ano, começaram a aparecer casos dos genótipos P[4], P[6] e P[10] e ainda as misturas de P[4]-P[6] e P[4]-P[10].

O fato de casos do genótipo P[4] intensificar-se a partir da época em que a vacina contra rotavírus foi introduzida no Calendário Nacional de Vacinação, pode ser um indicativo de que outros genótipos possam vir substituir o genótipo P[8], ao qual a vacina confere imunidade. Um estudo realizado em Aracajú-Sergipe de novembro de 2006 a fevereiro de 2007, com crianças de até 12 meses que receberam a vacina contra rotavírus e foram

atendidas com doença diarréica, demonstrou que o genótipo P[4] em combinação com o genótipo G2 foi encontrado na maioria das amostras pesquisadas (GURGEL et al., 2007).

A distribuição do genótipo P pelo mês de ocorrência pode ser visualizada na tabela 16.

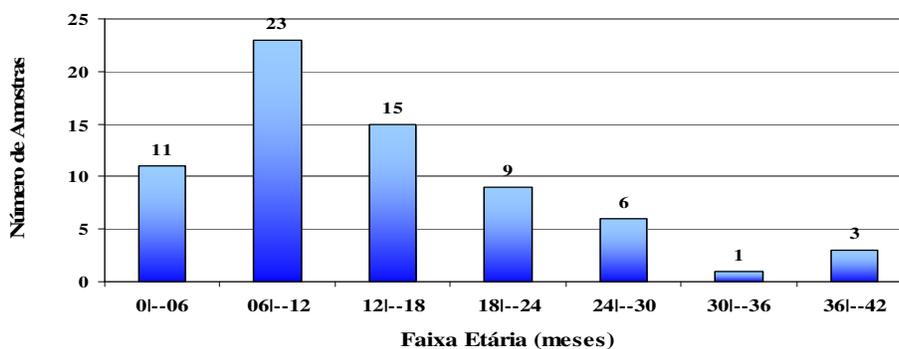


Gráfico 20 – Número de amostras positivas para o genótipo P em crianças de 1 a 36 meses distribuídas por faixa etária em Manaus, AM.

Tabela 15

Número de amostras positivas para o genótipo G em crianças de 01 a 36 meses, distribuídas por faixa etária em Manaus, AM.

Faixa Etária (meses)	Genótipo P							Não Tipadas	Total
	P[9]	P[4]	P[8]	P[6]	P[10]	P[4]-P[6]	P[4]-P[10]		
01--06	1	0	10	0	0	0	0	0	11
06--12	0	2	16	1	0	1	1	2	23
12--18	0	5	6	0	1	0	1	2	15
18--24	0	1	6	0	0	0	0	2	9
24--30	0	1	4	0	0	0	0	1	6
30--36	0	0	1	0	0	0	0	0	1
36--42	0	0	2	0	0	0	0	1	3
Total	1	9	45	1	1	1	2	8	68

Tabela 16

Distribuição da ocorrência de genótipos P por mês em amostras de fezes coletadas em Manaus, AM, de julho de 2004 a dezembro de 2006.

Genótipo P pelo mês e ano de ocorrência									
Mês/Ano	P[9]	P[4]	P[8]	P[6]	P[10]	P[4]- P[6]	P[4]- P[10]	Não tipadas	Total
Jul/04			2					1	3
Ago/04	1		2					2	5
Set/04			2						2
Out/04			2					1	3
Nov/04			4						4
Dez/04			3					1	4
Jan/05			1						1
Fev/05			1					1	2
Mar/05			6					1	7
Abr/05			4						4
Mai/05			3					1	4
Jul/05			1						1
Ago/05			1						1
Set/05		1	3						4
Out/05			3						3
Nov/05			1						1
Dez/05			3						3
Fev/06		1	2		1				4
Mar/06		1					1		2
Abr/06		1	1						2
Mai/06		1							1
Jun/06		2							2
Jul/06						1			1
Ago/06		1					1		2
Out/06		1							1
Dez/06				1					1
Total	1	9	45	1	1	1	2	8	68

Foram observadas quais as zonas da cidade de Manaus onde ocorreram os casos de genótipos P e se verificou que na zona leste foram encontradas 26 amostras positivas para o referido genótipo (38,2%), os demais casos aconteceram na nas zonas oeste, onde apareceram 15 amostras positivas para o genótipo (22,1%), norte com 12 casos (17,6%) e sul com 8 casos (1,8%), as zonas centro oeste e centro sul aparecem com um número menor de amostra

positivas. Quanto à distribuição dos genótipos P pelas zonas da cidade pode-se observar pela tabela 17 que genótipos P ficaram igualmente distribuídos em todas as zonas da cidade.

Tabela 17

Amostras positivas para o genótipo P distribuídas pelas zonas da cidade de Manaus, AM.

Genótipos G									
Zona Geográfica	P[9]	P[4]	P[8]	P[6]	P[10]	P[4]-P[6]	P[4]-P[10]	Não Tipadas	Total
Norte			10		1			1	12
Sul		1	4			1	1	1	8
Leste	1	5	17	1			1	1	26
Oeste		2	8					5	15
Centro-Oeste		1	1						2
Centro-Sul			4						4
Interior			1						1
Total	1	9	45	1	1	1	2	8	68

Foi avaliada a quantidade de episódios de diarreia por dia dos casos de crianças com amostras positivas para o genótipo P e observou-se que as 68 crianças tiveram um total de 668 episódios de diarreia, com uma média de 9,8 episódios de diarreia por dia e desvio padrão de 3,8. Pode-se verificar que 28 das 68 crianças com amostras positivas para o genótipo P (41,2%) apresentaram entre 10 a 16 episódios de diarreia por dia. As crianças com amostras positivas para o genótipo P[4] apresentaram acima de seis episódios de diarreia dia, sendo que uma criança positiva para este genótipo chegou a apresentar 20 episódios de diarreia no dia.

Outro fato que se destaca é que a única criança com amostra positiva do genótipo P[10] isolado apresentou 14 episódios de diarreia no dia, quando este genótipo aconteceu em mistura com P[4] o número de episódios também foi acima de 10 por dia.

Nos estudos sobre a caracterização molecular do rotavírus, que foram consultados, a severidade da doença diarréica por rotavírus não foi encontrado. Neste estudo parece ficar demonstrado que crianças com amostras positivas para genótipos P, como P[4] e P[10] podem apresentar um número de episódios de diarréia superior a crianças com positividade para outros genótipos P; porém, o número pequeno de amostras para estes genótipos não permite que essa afirmativa seja conclusiva.

A distribuição dos genótipos P e a distribuição da quantidade de episódios de diarréia por criança por dia podem ser avaliadas na tabela 18.

Tabela 18

Distribuição da quantidade de episódios de diarréia apresentados por crianças com amostras positivas para o genótipo P em Manaus, AM.

Genótipo P									
Episódios de diarréia/dia	P[9]	P[4]	P[8]	P[6]	P[10]	P[4]-P[6]	P[4]-P[10]	Não Tipadas	Total
2	1		1						2
3								1	1
4			3			1		1	5
5			1					1	2
6		2	3						5
7			3						3
8		1	3					1	5
9								1	1
10		3	12	1			1	1	18
11			1					1	2
12			9				1		10
13			1						1
14		2	2		1				5
15			5					1	6
16			1						1
20		1							1
Total	1	9	45	1	1	1	2	8	68

Além da quantidade de episódios de diarreia por dia, foi avaliado também o aspecto das fezes das 68 crianças positivas para o genótipo P e percebeu-se que 61 delas apresentaram fezes de aspecto líquido (89,7%) e outras sete crianças (10,3%) apresentaram fezes semi-líquidas.

A diarreia aquosa de aspecto gorduroso e caráter explosivo é uma característica comum da doença diarreica por rotavírus (RIBEIRO, 2006). Neste estudo este aspecto de fezes foi constatado tanto em amostras positivas para o rotavírus quanto em amostras positivas para os genótipos G e P.

A distribuição individual dos genótipos P pelo aspecto das fezes pode ser avaliada na tabela 19.

Tabela 19

Aspecto da amostra de fezes diarreicas positivas para o genótipo P apresentadas por crianças de Manaus, AM.

Aspecto das fezes em amostras positivas para genótipo P					
Aspecto/ Genótipo P	Líquidas	Semi- Líquidas	Pastosa	Semi- Pastosa	Total
P[9]	1				1
P[4]	7	2			9
P[8]	43	2			45
P[6]	1				1
P[10]	1				1
P[4]-P[6]		1			1
P[4]-P[10]	2				2
Não Tipadas	6	2			8
Total	61	7	0	0	68

Assim como nas amostras positivas para rotavírus e para o genótipo G, foram verificados quais sinais e sintomas da doença diarreica que as crianças com amostras positivas para o genótipo P apresentaram, e verificou-se que o vômito esteve presente em 58 das 68 crianças com amostras positivas para o genótipo (82,3%). Das 45 crianças com amostras positivas para o genótipo P[8], 39 crianças apresentaram vômito (86,7%) e 100% das crianças

com amostras caracterizadas como P[9] e P[10] e das misturas P[4]-P[10] e P[4]-P[6] apresentaram vômito durante a doença. A distribuição desse sinal pode ser verificada no gráfico 21.

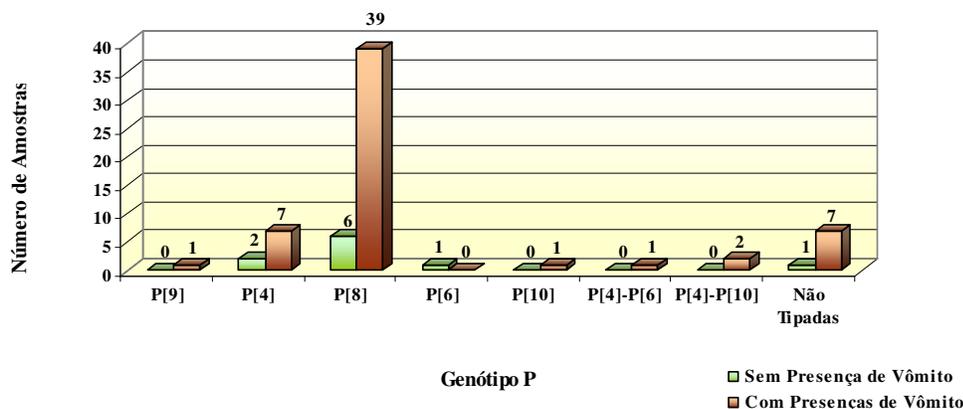


Gráfico 21 – Distribuição da presença de vômito em crianças com amostras positivas para o genótipo P em Manaus, AM.

Quanto à desidratação, esta foi referida por 57 (83,8%) responsáveis por crianças com amostras positivas para o genótipo P. Conforme os dados apresentados no gráfico 23, das 45 crianças com amostras positivas para P[8], há relatos de desidratação por 41 dos responsáveis (91,1%). Também se verificou que 100% das amostras caracterizadas como P[10] e a mistura P[4]-P[10] apresentaram sinais de desidratação e ainda que das nove crianças com amostras positivas para P[4] em sete havia este sinal (77,8%). Foi observado que as crianças com amostras positivas para P[9] e P[6] e para a mistura P[4]-P[6] não apresentaram sinais de desidratação. Estes dados podem ser avaliados no gráfico 22.

A presença do sintoma dor abdominal na positividade para o genótipo P também foi avaliada e percebe-se que das 68 crianças em 51 (75%), foi constatado o relato de dores

abdominais. Foi observado que nas crianças com amostras positivas para P[8] houve relato desse sintoma em 40 casos (88,9%). Verificou-se ainda que 100% das crianças com amostras positivas para P[9] e P[6] e para a mistura P[4]-P[6] apresentaram o sintoma. Em 66,7% de crianças positivas para o genótipo P[4] e 50% para a mistura dos genótipos P[4]-P[10] não houve relato de dores abdominais. O gráfico 23 mostra a distribuição do número de crianças com amostras positivas para os genótipos P que apresentaram dores abdominais.

A presença de Hipertermia foi outro sinal da doença diarréica avaliado nas crianças com amostras positivas para o Genótipo P e se percebeu que a presença deste sinal da doença aconteceu em menos de 50% das crianças positivas. As crianças com amostras positivas para o genótipo P[8] apresentaram padrão parecido com o aspecto geral encontrado, ou seja, das 45 crianças 23 (51,1%) não apresentaram o sintoma.

A distribuição dos casos de hipertermia em crianças com amostras positivas para o genótipo P pode ser visualizada no gráfico 24.

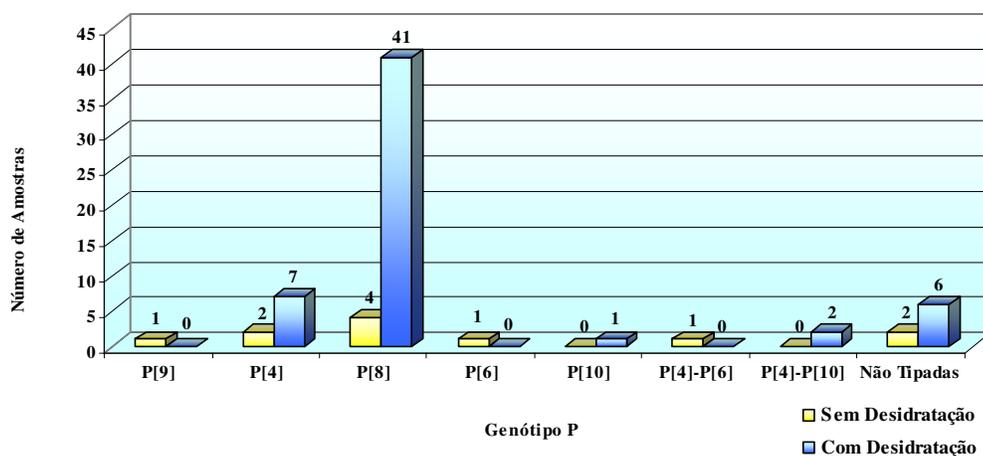


Gráfico 22 – Distribuição da presença de desidratação em crianças com amostras positivas para o genótipo G em Manaus, AM.

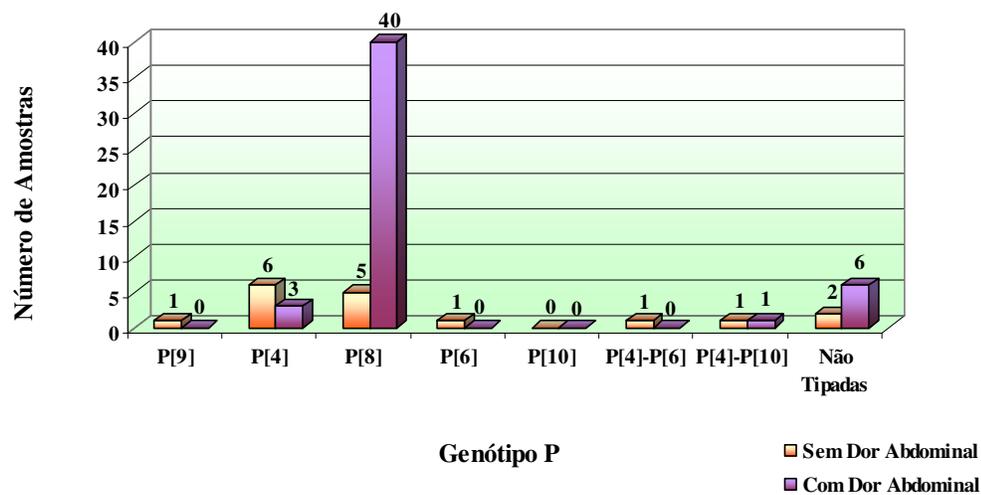


Gráfico 23 – Distribuição da presença de dores abdominais em crianças com amostras de fezes positivas para o genótipo P em Manaus, AM.

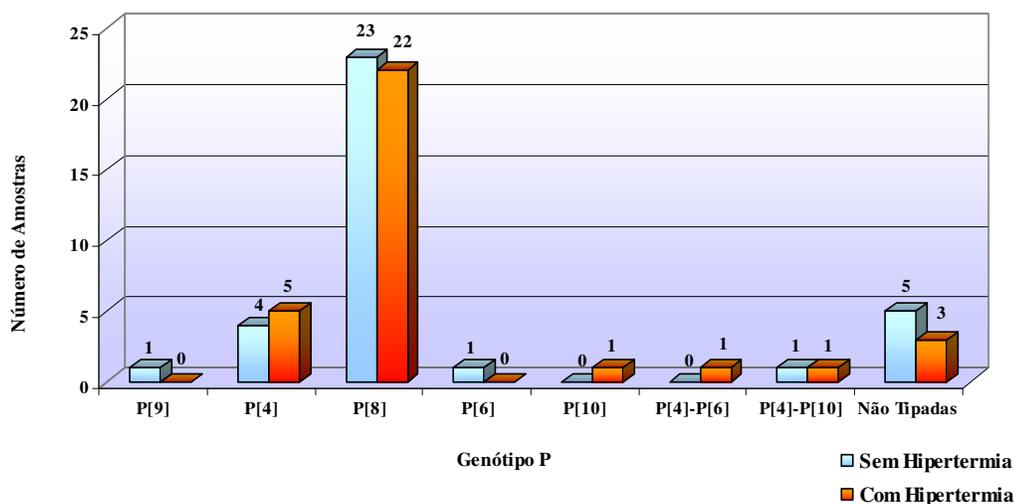


Gráfico 24 – Distribuição da presença de hipertermia em crianças com amostras de fezes positivas para o genótipo P em Manaus, AM

Os sinais e sintomas da doença por rotavírus não são específicos. Comumente a doença se inicia de forma abrupta com vômito (geralmente precedendo a diarreia), febre alta seguida de diarreia aquosa de aspecto gorduroso e caráter explosivo, podendo o quadro evoluir para desidratação (RIBEIRO, 2006). Os sinais e sintomas apresentados pelas crianças com amostras positivas para os genótipos P são em sua maioria os mesmos apresentados pela autora como a forma clássica da doença.

A existência de animais domésticos como cães, gatos e galinhas na residência de crianças com amostras positivas para o genótipo P foram analisados, sendo que 65 dos 68 responsáveis por crianças responderam a questão e percebe-se destas 65 amostras positivas em 34 (52,3%) a resposta sobre a existência de animais foi afirmativa, das oito amostras negativas para os genótipos P pesquisados, em quatro casos (50%) houve relatos da existência de animais domésticos na residência. A distribuição dos genótipos P pela existência ou não de animais domésticos na residência pode ser verificada na tabela 20.

Quanto às espécies dos 34 animais apresentados 28 eram cachorros (82,4%), outros três eram gatos e ainda em duas residências existia a presença tanto de cachorros como de gatos, também se pôde perceber uma amostra de P[8] onde havia uma outra espécie de animal na residência que no estudo foi caracterizado como “outros”. Nas quatro residências onde foi relatada a existência de animais e que apresentaram negatividade para os genótipos P pesquisados os animais citados foram cachorros. A tabela 21 nos mostra a espécie de animais relatados em residências de crianças com amostras positivas para o genótipo P.

Quanto à existência de galinhas na residência das crianças com amostras positivas para o genótipo P pôde-se perceber que em 58 (85,3%) das 68 residências onde foram encontradas amostras positivas para o genótipo P, não havia relato da existência de galinhas no local. Nos casos negativos para os genótipos P pesquisados não havia nenhum com referência à existência dessa espécie de ave na residência.

Os genótipos P mais prevalentes mundialmente são os P[4] e P[8] (SANTOS et al., 2005), tendo sido estes genótipos os mais encontrados neste estudo, porém alguns dos genótipos caracterizados como P na primeira amplificação não apresentaram características de nenhum dos genótipos P pesquisados, podendo estes pertencer tanto a grupos não pesquisados como a tipos pertencentes a animais. A presença de misturas de genótipos P humano e animal foi constatada por Macedo et al. (2007), em crianças de Teresina no Piauí, a autora constatou nesse estudo que 27,6% das crianças apresentavam amostras de genótipos P com estas características, porém nesse estudos não foram analisadas a convivência das crianças positivas para este tipo de amostras com animais doméstico.

Os genótipos de origem animal não foram alvo deste estudo, assim, não se pode concluir que as amostras que não foram caracterizadas para os genótipos P possam mesmo pertencer ao grupo de genótipos normalmente encontrados em animais, destarte, para chegar a essa conclusão, são necessários estudos mais detalhados sobre o assunto, com a utilização de primers específicos para a caracterização de genótipos animal.

Tabela 20

Presença de animais domésticos em residências de crianças com amostras de fezes positivas para o genótipo P.

Existência de animais domésticos em residência de crianças com amostras positivas para os genótipos P			
Genótipo P	Existência de Animais	Não Existência de Animais	Total
P[9]	1	0	1
P[4]	3	6	9
P[8]	23	20	43
P[6]	1	0	1
P[10]	1	0	1
P[4]-P[6]	0	1	1
P[4]-P[10]	1	1	2
Não Tipadas	4	3	7
Total	34	31	65

Tabela 21

Presença de animais domésticos divididos por espécies em residências de crianças com amostras de fezes positivas para o genótipo P.

Animais existentes em residências de crianças com amostras de fezes positivas para genótipo P					
Genótipo P	Cachorro	Gato	Cachorro e gato	Outros	Total
P[9]	1	0	0	0	1
P[4]	3	0	0	0	3
P[8]	17	3	2	1	23
P[6]	1	0	0	0	1
P[10]	1	0	0	0	1
P[4]-P[6]	0	0	0	0	0
P[4]-P[10]	1	0	0	0	1
Não Tipadas	4	0	0	0	4
Total	28	3	2	1	34

5. CONCLUSÃO

- 5.1. A ocorrência de rotavírus em amostras de fezes diarréicas de crianças de 1 a 36 meses atendidas em prontos socorros infantis do município de Manaus, AM foi de 25%.
- 5.2. Pela genotipagem das amostras positivas para rotavírus humanos através do método de RT-PCR, ficou constatado que 49,3% destas amostras pertenciam aos genótipos P ou G e que outras 50,1% não apresentavam características de nenhum dos dois genótipos pesquisados.
- 5.3. Os genótipos G foram encontrados em 30,7% das amostras positivas para rotavírus humano com predominância dos genótipos G2 (17%), seguidos de G1 (14,9%) e G9 (10,6%), os genótipos G3 foram encontrados em 4,3% das amostras positivas. A mistura dos genótipos G1-G9 foi encontrada em 12,8% das amostras e da mistura de G1-G3 em 2,1%.
- 5.4. Trinta e oito por cento das amostras positivas para o genótipo G não apresentaram características de nenhum dos genótipos G pesquisados, indicando a possibilidade da circulação de genótipos G incomuns na região.
- 5.5. Os genótipos P foram encontrados em 44,7% das amostras positivas para rotavírus humano, sendo que o genótipo P[8] foi encontrado na grande maioria das amostras (66,2%), já o genótipo P[4] também aconteceu em 13,2% de amostras. Os genótipos

P[9], P[6] e P[10] e as misturas dos genótipos P[4]-P[6] e P[4]-P[10] foram encontrados em um número reduzido de amostras.

5.6. As combinações dos genótipos P e G foram responsáveis por 53,3% das 152 amostras positivas para rotavírus humanos, tendo sido encontradas as combinações mais comumente encontradas mundialmente, como P[8]G1 (12,3%), P[4]G2 (10%), P[8]G3 (5%). Foram observadas também combinações consideradas incomuns, como P[9]G2 (2,5%), P[4]G1 (2,5%), P[8]G9 (2,5%) e P[10]G1 (2,5%). A Combinação P[8]G1G9 foi encontrado em 10% das amostras e as combinações de P[6]G1-G9 e P[4]G1-G3 em 2,5% das amostras que apresentaram combinações dos genótipos P e G.

5.7. Foi observado que 10% das combinações dos genótipos P e G não apresentavam características nem dos genótipos P, nem dos genótipos G pesquisados. Também se verificou 12,5% de combinações de P[8] e 5% de P[4] com genótipos G não tipados.

5.8. As combinações de P[8]G1 aconteceram até fevereiro de 2006, época da introdução da vacina contra rotavírus no Calendário Nacional de Imunização do PNI, sendo que na mesma época se acentuaram os casos de P[4]G1 e P[4]G2, o que pode ser indicador da possibilidade da circulação de novos genótipos após a introdução da vacina.

5.9. Tanto crianças do sexo masculino quanto crianças do sexo feminino apresentaram números semelhantes de amostras positivas para rotavírus humano e para os genótipos G e P.

- 5.10. As crianças com idade até 18 meses representaram 76,9% das amostras positivas para rotavírus humanas, 72,4% dos positivos para os genótipos G e 85,3% das amostras para os genótipos P, o que indica que esta é a faixa etária mais atingida pela doença diarréica pelo rotavírus.
- 5.11. Os casos de rotavírus humano, bem como das amostras positivas para os genótipos G e P ocorreram de forma similar durante todo o período do estudo.
- 5.12. A maioria dos casos de rotavírus humano e de casos positivos para os genótipos G e P foram encontrados em crianças moradoras na zona leste da cidade de Manaus.
- 5.13. Tanto os genótipos G quanto os genótipos P foram encontradas em todas as zonas de Manaus, Am.
- 5.14. A média de episódios de diarréia por dia foi semelhante em crianças com amostras positivas para rotavírus e crianças com amostras negativas para o patógeno, indicando que a severidade da doença diarréica por rotavírus, quando relacionadas ao número de episódios de diarréia por dia, pode ser semelhante a outras doenças diarréicas.
- 5.15. As crianças com amostras positivas para o Genótipo G e para o genótipo P apresentaram média de episódios de diarréia por dia de 9,3 e 9,8 episódios de diarréia consecutivamente.

- 5.16. As fezes de aspecto líquido foram encontradas em 86,2% amostras positivas para rotavírus, em 83% das amostras positivas para o genótipo G e em 89,7% das amostras positivas para o genótipo P.
- 5.17. O vômito, a desidratação e as dores abdominais estiveram presentes em um número expressivos de crianças com amostras positivas para rotavírus, bem como em crianças com amostras positivas para os genótipos G e P. Já a hipertermia foi observada em menos da metade dos casos positivos para a doença.
- 5.18. Foi observada a existência de animais domésticos na residência de quase metade das crianças com amostras positivas para o rotavírus. Em residências onde habitavam crianças com amostras positivas para o genótipo G estes animais foram encontrados em 53, 2% e nas de crianças com amostras positivas para os genótipos P estes foram encontrados em 50%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, H. M.; COULTER, J. B. S.; NAKAGOMI, O.; HART, C. A.; ZAKI, J. M.; AL-RABATY, A. A.; DOVE, W.; CUNLIFFE, N. A. Molecular Characterization of Rotavirus Gastroenteritis Strains, Iraqi Kurdistan. *Emerging Infectious Diseases*, v.12, n.5, 2006.

ANDREASI, M. S. A.; BATISTA, S. M. F.; TOZETTI, I. A.; OZAKI, C. O.; NOGUEIRA, M. M.; FIACCADORI, F. S.; BORGES, A. M. T.; SANTOS, R. A. T.; CARDOSO, D. D. P. Rotavírus A em crianças de até três anos de idade, hospitalizadas com gastroenterite aguda em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.40, n.4, 2007.

ARAÚJO, I. T.; FERREIRA M. S. R.; FIALHO, A. M.; ASSIS, R. M.; CRUZ, C. M.; ROCHA M.; LEITE, J. P. G. Rotavirus Genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in Hospitalized Children with Acute Gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, p. 1999-2001, 2001.

ARGÜELLES, M. H.; VILLEGAS, G. A.; CASTELLO, A.; ABRAMI, A.; GHIRINGHELLI, P. D.; SEMORILE, L.; GLIKMANN G. VP7 and VP4 Genotyping of Human Group A Rotavirus in Buenos Aires, Argentina. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.1, p. 352-259, 2000.

BÁNYAI, K.; GENTSCH, J. R.; SCHIPP, R.; JAKAB, F.; BENE, J.; MELEGH, B.; GLASS, R. I.; SZÜCS, G. Molecular epidemiology of human P[8],G9 rotaviruses in Hungary between 1998 and 2001. *Journal of Medical Microbiology*, v.53, p. 791-801, 2004.

BENEDET, S. A.; BUB, M. B. C. **Manual de diagnóstico de Enfermagem: Uma abordagem baseada na teoria das necessidades humanas básicas e na classificação NANDA**. 2.ed. Santa Catarina: Bernúncia, 2001.

BON, F.; FROMANTIN, C.; AHO, S.; POTHIER, P.; KOHLI, E. G and P Genotyping of Rotavirus Strains Circulating in France over a Three-Year Period: Detection of G9 and P[6] Strains at Low Frequencies. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.4, p. 1681-1683, 2000.

BOMSEL, M.; ALFSEN A. Entry of Viruses through the Epithelial Barrier: Pathogenic Trickery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, V. 4, p. 57-68, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doença Diarréica pó Rotavírus: vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano (VORH) Versão Preliminar**, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doença Diarréica pó Rotavírus: vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano (VORH)**, 2006.

BREVIGLIERI, J. C. Rotavírus humanos. Morfología e patogenia. *Revista Pediatria (São Paulo)*, v.1, p. 314-318, 1979.

BRICKS, L. F. Rotavírus: atualização sobre doenças e vacinas. *Revista Pediatria (São Paulo)*, v.27, p. 252-66, 2005.

CANDEIAS, J. A. N.; ROSENBERG, Cornélio P.; RÁCZ, M. L. Identificação por contraímunoelctroforese de rotavírus em casos de diarreia infantil. *Revista de Saúde Pública*, v.12, n.1, 1978.

CARMO, E. H. Diarrheic disease due to rotavirus: magnitude, introduction of the vaccine, and challenges for epidemiological surveillance. *Cadernos de Saúde Pública*, v.22, n.11, 2006.

CARMONA, R. C. C.; TIMENETSKY, M. C. S. T.; MORILLO, S. G.; RICHTZENHAIN, L. J. Human Rotavirus Serotype G9, São Paulo, Brazil, 1996–2003. *Emerging Infectious Diseases*, v.12, n.6, 2006.

CARNEIRO, N. B.; DINIZ-SANTOS, D. R.; FAGUNDES, S. Q.; NEVES, L. L.; REGES, R. M. B.; LIMA, E. K. P.; QUADROS, V. H. O.; SOARES, L. E. J.; SILVA, F. S. R.; SCHNEITER, H. G.; FIGUEIREDO, Í.; SILVA, L. R. Clinical and epidemiological aspects of children hospitalized with severe rotavirus-associated gastroenteritis in Salvador, BA, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.9, n.6, p. 525-528, 2005.

CARVALHO-COSTA, F. A.; ASSIS, R. M.; FIALHO, A. M.; BÓIA, M. N.; ALVES, D. P. D.; MARTINS, C. M. M. A.; LEITE, J. P. G. Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.101, n.3, 2006.

CASTELLO, A. A.; ARGÜELLES, M. H.; ROTA, R. P.; OLTHOFF, A.; JIANG, B.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R.; GLIKMANN, G. Molecular Epidemiology of Group A Rotavirus Diarrhea among Children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and Emergence of the Infrequent Genotype G12. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, n.6, p. 2046-2050, 2006.

CHIZHIKOV, V.; WAGNER, M.; IVSHINA, A.; HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A. Z.; CHUMAKOV, K. Detection and Genotyping of Human Group A Rotaviruses by Oligonucleotide Microarray Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.7, p. 2398-2407, 2002.

COIRO, J. R. R.; ALMEIDA NETO, A. J.; HEUSER, M. C. F.; BENDATI, M. M.; VASCONCELLOS, V. L.; STARHAN, M.; RODRIGUES, J. J. S. Pesquisa exploratoria sobre a presença de rotavírus associado a gastroenterite aguda em crianças de Manaus (Amazonas) / Research about presence of rotavirus associated with acute gastroenteritis from childrens in Manaus (Amazon). *Revista Acta Amazônica*, v.13, n.3-4, p. 531-6, 1983.

COLUCHI, N.; MUNFORD, V.; MANZUR, J.; VAZQUEZ, C.; ESCOBAR, M.; WEBER, E.; MÁRMOL, P.; RÁCZ, M. L. Detection, Subgroup Specificity, and Genotype Diversity of Rotavirus Strains in Children with Acute Diarrhea in Paraguay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.5, p. 1709-1714, 2002.

COSTA, C.; CANDEIAS, J. A. N.; CAPELETTI, E. L. L. Eletroferótipos de rotavírus em crianças com e sem quadros de gastroenterite. *Revista de Saúde Pública*, v.24, n.2, 1990.

COSTA, C.; TIMESNESTSKY, M. C. S. T.; CARMONA, R. C. C. Human Rotavirus G and P Genotypes in Manaus-AM. In III Encontro do Instituto Adolfo Lutz, 1977, São Paulo. **Anais do III Encontro do Instituto Adolfo Lutz**. Instituto Adolfo Lutz, 1997. p. 307.

COSTA, C. A. Epidemiologia de Rotavírus na Cidade de Manaus/Am. **Relatório Final - Projeto PPI-2205**. Diagnóstico Microbiológico de Doenças Incidentes da Amazônia, 2006.

COSTA, P. S. S.; CARDOSO, D. D. P.; GRISI, S. J. F. E.; SILVA, P. A.; FIACCADORI, F.; SOUZA, M. B. L. D.; SANTOS, R. A. T. Rotavirus A infections and reinfections: genotyping and vaccine implications. *Jornal de Pediatria*, v.80, n.2, p. 119-22, 2004 a.

COSTA, P. S. S.; GRISI, S. J. F. E.; CARDOSO, D. D. P.; FIACCADORI, F. S.; SOUZA, M. B. L. D.; SANTOS, R. A. T. Manifestações clínicas e epidemiológicas das infecções por Rotavirus A. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.26, n.3, p. 151-8, 2004 b.

DAS, S.; SEN, A.; UMA, G.; VARGHESE, V.; CHAUDHURI, S.; BHATTACHARYA, S. K.; KRISHNAN T.; DUTTA, P.; DUTTA, D.; BHATTACHARYA, M. K.; MITRA, U.; KOBAYASHI N.; NAIK, T. N. Genomic Diversity of Group A Rotavirus Strains Infecting Humans in Eastern India. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.1, p. 146-149, 2002.

ESTES, M. K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews*, p. 410-449, 1989.

FERNANDES, J. V.; FONSECA, S. M. D.; AZEVEDO, J. C. V.; MARANHÃO, H. S.; FONSECA, M. H. M.; DANTAS, M. T.; MEISSNER, R. V. Rotavirus detection in feces of children with acute diarrhea. *Jornal de Pediatria*, v.76, n.4, p. 300-4, 2000.

FERNÁNDEZ, M. A. G.; RODRIGUES, R. H.; BLAY, L. S. Rotavírus: Enfermedad emergente de transmisión digestiva. *Revista Cubana de Pediatria*. v. 75, N. 1 p. 2003.

FISCHER, T. K.; STEINSLAND, H.; MOLBAK, K.; CA, R.; GENTSCH, J. R.; VALENTINER-BRANTH, P.; AABY, P.; SOMMERFELT, H. Genotype Profiles of Rotavirus Strains from Children in a Suburban Community in Guinea-Bissau, Western Africa. *Journal of Clinical Microbiology*, v.3, n.1, p. 264-267, 2000.

FISCHER, T. K.; EUGEN-OLSEN, J.; PEDERSEN, A. G.; MOLBAK, K.; BÖTTIGER, B.; ROSTGAARD, K.; NIELSEN, N. M. Characterization of Rotavirus Strains in a Danish Population: High Frequency of Mixed Infections and Diversity within the VP4 Gene of P[8] Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, n.3, p. 1099-1104, 2005.

GLASS, R. I. Combate ao Rotavírus. *Revista Científica American*, ed.48, 2006.

GENTSCH, J. R.; GLASS, R. I.; WOODS, P.; GOUVEA, V.; GORZIGLIA, M.; FLORES, J.; DAS. BIMAL, K.; BHAN, M. K. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30 p. 1365-1373, 1992.

GENTSCH, J. R.; LAIRD, A. R.; BIELFELT, B.; GRIFFIN, D. D.; BANYAI, K.; RAMACHANDRAN, M.; JAIN V.; CUNLIFFE, N. A.; NAKAGOMI, O.; KIRKWOOD, C.

D.; FISCHER, T. K.; PARASHAR, U. D.; BRESEE, J. S.; JIANG, B.; GLASS, R. I. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 192, p. 146-159, 2005.

GILIO, A. E.; BALDACCI, E. R.; OKAY, Y. Introdução ao estudo do Rotavírus. *Revista Pediatria (São Paulo)*, v.14, n.2, p.49-54, 1992.

GOUVEA, V.; GLASS, R. I.; WOODS, P.; TANIGUCHI, K.; CLARK, H. F.; FORRESTER, B.; FANG, Z. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, p. 276-282, 1990.

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M. C. S. Identification of Bovine and Porcine Rotavirus G Types by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, V.32, N.5, p. 1338-1340, 1994a.

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M. C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, p. 1333-1337, 1994b.

GURGEL, R. Q.; CUEVAS, L. E.; VIEIRA, S. C. F.; BARROS, V. C. F.; FONTES, P. B.; SALUSTINO, E. F.; NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T.; DOVE, W.; CUNLIFFE, N.; HART, C. A. Predominance of Rotavirus P[4]G2 in a Vaccinated Population, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.13, n.10, 2007.

HEIDE, R. V. D.; KOOPMANS, M. P. G.; SHEKARY, N.; HOUWERS, D. J.; DUYNHOVEN, Y. T. H. P. V.; POEL, W. H. M. V. D. Molecular Characterizations of Human and Animal Group A Rotaviruses in The Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, n.2, p. 669-675, 2005.

HERRING, A. J.; INGLIS, N. F.; OJEH, C. K.; SNODGRASS, D. R.; MENZIES, J. D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained Polyacrylamide gels. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 16, p. 473-477, 1982

KALE, P. L.; FERNANDES, C.; NOBRE, F. F. Padrão temporal das internações e óbitos por diarreia em crianças, 1995 a 1998, Rio de Janeiro. *Revista de Saúde Pública*, v.38, n.1, 2004.

LAIRD, A. R.; IBARRA, V.; RUIZ-PALACIOS, G.; GUERRERO, M. L.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R. Unexpected Detection of Animal VP7 Genes among Common Rotavirus Strains Isolated from Children in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, v.49, p. 4400-4403, 2003.

LEITE, J. P.; ALFIERI, A.A.; WOODS P.A.; GLASS R.I.; GENTSCH J. R. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Archives of Virology*, v.141, n.12, p. 2365-74, 1996.

LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; MASCARENHAS, J. D. P.; FREITAS, R. B.; OLIVEIRA, C. S.; BELLESI, N.; MONTEIRO, T. F.; LINS-LAINSON, Z.; RAMOS, F. L. P.; VALENTE, S. A. Estudo prospectivo das infecções por rotavírus em Belém, Pará, Brasil: uma abordagem clínico-epidemiológica. *Jornal de Pediatria*, v.70, n.7, p. 220-225, 1994.

LINHARES, A. C. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. *Caderno de Saúde Pública*, v.16, n.3, p. 629-646, 2000.

LUZ, C. R. N. E.; MASCARENHAS, J. D. P.; GABBAY, Y. B.; MOTTA, A. R. B.; LIMA, T. V. R.; SOARES, L. S.; LINHARES, A. C. Rotavirus serotypes and electropherotypes identified among hospitalised children in São Luís, Maranhão, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.47, n.5, 2005.

MACEDO, C. I.; CHRISTOFOLETTI, A.; MUNFORD, V.; RÁCZ, M. L. G and P rotavirus genotypes in stool samples from children in Teresina, State of Piauí. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.40, n.4, 2007.

MANRIQUE-ABRIL, F. G.; TIGNE, D. B. Y.; BELLO, S. E.; OSPINA, J. M. Agentes causantes de Diarrea en Niños Menores de 5 Años en Tunja, Colômbia. *Revista de Salud Pública*, v.8, n.1, 2006.

MASCARENHAS, J. D. P.; GUSMÃO, R. H. P.; BARARDI, C. R. M.; PAIVA, F. L.; SIMÕES, C. O.; GABBAY, Y. B.; MONTEIRO, T. A. F.; LINHARES, A. C. Characterization of rotavirus p genotypes circulating among paediatric inpatients in northern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.41, n.3, p. 165-170, 1999.

MASCARENHAS, J. D. P.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; LEITE, J. P. G. Detection and Characterization of Rotavirus G and P Types from Children Participating in a Rotavirus Vaccine Trial in Belém, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, p. 113-117, 2002.

MERCK & CO. **The Manual Merck- Home Edition**. 1.ed. São Paulo: Manole Ltda, 2002.

MIAGOSTOVICH, M. P.; FERREIRA, F.F. M.; GUIMARÃES, F. R.; FUMIAN, T. M.; DINIZ-MENDES, L.; LUZ, S. L. B.; SILVA, L. A.; LEITE, J. P. G. Molecular Detection and Characterization of Gastroenteritis Viruses Occurring Naturally in the Stream Waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n.2, p. 375-382, 2008.

MONTENEGRO, F. M. U.; CORREIA, J. B.; FALBO, A. R.; DOVE, W.; NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O.; CUEVAS, L. E.; CUNLIFFE, N. A.; HART, C. A.. Anticipating rotavirus vaccines in Brazil: Detection and molecular characterization of emerging rotavirus serotypes G8 and G9 among children with diarrhoea in Recife, Brazil. *Journal of Medical Virology*, v.79, ed.3, p. 335-340, 2007.

MOTA-HERNÁNDEZ, F.; CALVA, J. J.; GUTIÉRREZ-CAMACHO, C.; VILLA-CONTRERAS, S.; ARIAS, C. F.; PADILLA-NORIEGA, L.; GUISCAFRÉ-GALLARDO, H.; GUERRERO, M. L.; LÓPEZ, S.; MUÑOZ, O.; CONTRERAS, J. F.; CEDILLO, R.; HERRERA, I.; PUERTO, F. I. Rotavirus Diarrhea Severity Is Related to the VP4 Type in Mexican Children. Rotavirus Diarrhea Severity Is Related to the VP4 Type in Mexican Children. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.7, p. 3158-3162, 2003.

MOYO, S. J.; GRO, N.; KIRSTI, V.; MATEE, M. I.; KITUNDU, J.; MASELLE, S. Y.; LANGELAND, N.; MYRMEL, H.. Prevalence of enteropathogenic viruses and molecular characterization of group A rotavirus among children with diarrhea in Dar es Salaam Tanzania. *BMC Public Health*, v.7, p. 359, 2007.

MUNFORD, V.; SOUZA, E. C.; CARUZO, T. A. R.; MARTINEZ, M. B.; RÁCZ, M. L. Serological and molecular diversity of human rotavirus in São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, p. 459-466, 2007.

NAKAGOMI T, CORREIA J.B; NAKAGOMI O; MONTENEGRO F. M; CUEVAS L. E; CUNLIFFE N. A; HART C. A. Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis, *Official Journal of the Virology Division of the International Union of microbiological Societies*, 2008.

OLIVEIRA, A. J.; COSTA, D. P. A análise da moradia em Manaus (AM) como estratégia de compreender a cidade. *Revista Eletrônica de Geografia e Ciências Sociais*, v.11, n.245, 2007.

ORLANDI, P. P.; SILVA, T.; MAGALHÃES, G. F.; ALVES, F.; CUNHA, R. P. A.; DURLACHER, R.; SILVA, L. H. P. Enteropathogens Associated with Diarrheal Disease in Infants of Poor Urban Areas of Porto Velho, Rondônia: a Preliminary Study. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.96, n.5, p. 621-625, 2001.

ORLANDI, P. P.; MAGALHÃES, G. F.; MATOS, N. B.; SILVA, T.; PENATTI, M.; NOGUEIRA, P. A.; SILVA, L.H. Pereira da. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.39, n.4, p. 507-517, 2006.

O'MAHONY, J; FOLEY, B.; MORGAN, S.; MORGAN, J. G.; HILL, C. VP4 and VP7 Genotyping of Rotavirus Samples Recovered from Infected Children in Ireland over a 3-Year Period. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.6, p. 1699-1703, 1999.

PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J. P. G.; CANDEIAS, J. A. N.; RÁCZ, M. L.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; TRABULSI, L. R. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, Sao Paulo and Pará, Brazil. *J. Hyg*, v. 90, p. 117-125, 1983.

PHAN, T. G.; KHAMRIN, P.; QUANG, T. D.; DEY, S. K.; TAKANASHI, S.; OKITSU, S.; MANEEKARN, N.; USHIJIMA, H. Detection and Genetic Characterization of Group A Rotavirus Strains Circulating among Children with Acute Gastroenteritis in Japan. *Journal of Virology*, v.81, n.9, p. 4645-4653, 2007.

RÁCZ, M.L; KROEFF, S.S; MUNFORRD, V; CARUZO, T. A.R; DURIGON, E.L; HAYASHI, V. G; PALOMBO. E.A. Molecular Characterization of Porcine Rotaviruses from the Southern Region of Brazil: Characterization of an Atypical Genotypes G[9] Strain. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.6, p. 2443-2446, 2000.

RAMACHANDRAN, M.; GENTSCH, J. R.; PARASHAR, U. D.; JIN, S.; WOODS, P. A.; HOLMES, J. L.; KIRKWOOD, C. D.; BISHOP, R. F.; GREENBERG, H. B.; URASAWA, S.; GERNA, G.; COULSON, B. S.; TANIGUCHI, K.; BRESEE, J. S.; GLASS, R. I. Detection and Characterization of Novel Rotavirus Strains in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n.11, p. 3223-3229, 1998a.

RAMACHANDRAN, M.; VIJ, A.; KUMAR, R.; DAS, B. K.; GENTSCH, J. R.; BHAN, M. K.; GLASS, R. I. Lack of Maternal Antibodies to P Serotypes May Predispose Neonates to

Infections with Unusual Rotavirus Strains. *Clinical and Vaccine Immunology*, v.5, n.4, p. 527-530, 1998b.

RAMANI, S.; KANG, G.. Burden of disease & molecular epidemiology of group A rotavirus infections in India. *Indian Journal of Medical Research*, v.125, p. 619-632, 2007.

RIBEIRO, Maria Celeste Soares. rotavirose. In AGUIAR, Zenaide Neto; RIBEIRO, Maria Celeste Soares. **Vigilância e Controle das Doenças Transmissíveis**. 2.ed. São Paulo: Ed. Martinari, 2006.

ROCHA, L. A. **Aspecto Epidemiológico e Clínico do Rotavírus em Crianças Hospitalizadas com Diarréia Aguda em Manaus**, Brasil. Manaus: UFAM/INPA, 2003. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical), Universidade Federal do Amazonas/Instituto de Pesquisas da Amazônia, 2003.

SANTOS, N.; GOUVEA, V. Infecções por rotavírus: aspectos atuais. *Jornal Brasileiro de Patologia*, v. 33, p. 94-98, 1997.

SANTOS, N.; LIMA, R. C. C.; PEREIRA, C. F. A.; GOUVEA, V. Detection of Rotavirus Types G8 and G10 among Brazilian Children with Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n.9, p. 2727-2729, 1998.

SANTOS, N.; SOARES, C. C.; VOLOTÃO, E. M.; ALBUQUERQUE, M. C. M.; HOSHINO, Y. Surveillance of Rotavirus Strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.7, p. 3399-3402, 2003.

SANTOS, N.; VOLOTÃO, E. M.; SOARES, C. C.; CAMPOS, G. S., SARDI, S. I.; HOSHINO, Y. Predominance of Rotavirus Genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 Seasons among Hospitalized Children in the City of Salvador, Bahia, Brazil: Implications for Future Vaccine Strategies. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, n.8, p. 4064-4069, 2005.

SERRAVALLE, K.; SANTOS, N.; SARDI, S. I.; SILVA, S. P. S.; RIBEIRO JUNIOR, H. C.; MATTOS, Â. P.; CAMPOS, G. S. Molecular characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Salvador, Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.11, n.1, 2007.

SILVA, M. L. R.; NAVECA, F. G.; CARVALHO, I. P. Epidemiological aspects of rotavirus infections in Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.5, n.4, 2001.

SILVA, M. L. R.; CARVALHO, I. P.; GOUVEA, V. 1998-1999 Rotavirus Seasons in Juiz de Fora, Minas Gerais Detection of na Unusual G3P[4] Epidemic Strain. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.8, p. 2837-2842, 2002.

SILVEIRA, W. C. **Desenvolvimento de Teste Rápido para Detecção de Rotavírus: imunoensaio de captura e aglutinação em látex**. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2005. Dissertação (Mestre em Tecnologia em Imunobiológicos), Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Instituto Oswaldo Cruz, 2005.

SONNEN, G.; HENRY, N. Rotavírus. In WILSON, Walter R; SANDE, Merle A. **Doenças Infecciosas: Diagnóstico e Tratamento**. 1. Ed. Porto Alegre: Artemed, 2004.

UCHIDA, R.; PANDEY, B. D.; SHERCHAND, J. B.; AHMED, K.; YOKOO, M.; NAKAGOMI, T.; CUEVAS, L. E.; CUNLIFFE, N. A.; HART, C. A.; NAKAGOMI, O. Molecular Epidemiology of Rotavirus Diarrhea among Children and Adults in Nepal: Detection of G12 Strains with P[6] or P[8] and a G11P[25] Strain. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, n.10, p. 3499-3505, 2006.

UNICOMB, L. E.; PODDER, G.; GENTSCH, J. R.; WOODS, P. A.; HASAN, K. Z.; FARUQUE, A. S. G.; ALBERT, M. J.; GLASS, R. I. Evidence of High-Frequency Genomic Reassortment of Group A Rotavirus Strains in Bangladesh: Emergence of Type G9 in 1995. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.6, p. 1885-1891, 1999.

VRANJAC, A. Diarréia e rotavírus. *Revista de Saúde Pública*, v.38, n.6, 2004.

VERGARA, R. F.; NAVARRETE, M. S.; NÚÑEZ, E.; ESCOBAR, L.; NAVARRO, S. G.; VENEGAS, G. E.; SCHUFFENEGER, P.; O'RYAN, M. Impacto de gastroenterite severa para rotavírus em crianças chilenas menor de 3 anos de idade. *Revista médica de Chile*, v.135, p. 975-981, 2007.