

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

CYNTHIA COSTA PINTO

**ROTAVÍRUS EM CRIANÇAS DE 0 A 12 MESES VACINADAS
E NÃO VACINADAS ATENDIDAS NOS PRONTOS
SOCORROS INFANTIS DE MANAUS, AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Patologia Tropical 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
2009**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Pinto, Cynthia Costa

P659r Rotavírus em crianças de 0 a 12 meses vacinadas e não vacinadas atendidas nos prontos socorros infantis de Manaus, Amazonas/ Cynthia Costa Pinto. - Manaus: UFAM, 2009.

68 f. : il. color.; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical, área de concentração diagnóstico e controle) — Universidade Federal do Amazonas, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Cristóvão Alves da Costa.

1. Diarréia em crianças 2. Rotavírus 3. Vacinas 4. Reação em cadeia de polimerase I. Costa, Cristovão Alves da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 616.34-053.2(811.3)(045.3)

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

**ROTAVÍRUS EM CRIANÇAS DE 0 A 12 MESES VACINADAS
E NÃO VACINADAS ATENDIDAS NOS PRONTOS
SOCORROS INFANTIS DE MANAUS, AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Patologia Tropical 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 20 de julho de 2009

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^o. Dr. Felipe Gomes Naveca
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/AM

Prof^o. Dr. Wornei Silva Miranda Braga
Fundação de Medicina Tropical – FMT/AM

DEDICATÓRIA

A Deus, por guiar meus passos e iluminar os caminhos trilhados, dando sabedoria e perseverança para finalizar este projeto, para, enfim, contribuir para a melhoria dos serviços de saúde.

A minha família:

Meus pais Wandemberg e Veranice, que com muito esforço e dedicação abriram as portas do mundo ao instituírem a base da minha formação.

Minha irmã Lorena, que sempre esteve ao meu lado apoiando e ajudando sempre.



AGRADECIMENTOS

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.

Ao Dr. Jansen Fernandes de Medeiros pelo auxílio na elaboração do artigo científico e análises dos resultados do projeto.

À enfermeira Denise Colosso Rangel pela coleta das amostras e cessão do projeto.

À Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Amazonas por permitir a coleta do material necessário ao desenvolvimento da pesquisa nas instituições infantis de sua jurisdição.

Aos diretores dos Hospitais e Prontos Socorros da Criança da Zona Leste, Zona Oeste e Zona Sul por permitirem a coleta de material nessas instituições.

Ao Instituto da Criança do Amazonas (ICAM) por permitir a coleta de material nessa instituição.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas pelo auxílio financeiro que me permitiu a dedicação exclusiva ao desenvolvimento do projeto.



RESUMO

Os rotavírus humanos constituem uma das mais importantes causas de doença diarreica em crianças menores de cinco anos no mundo. Em 2006, o Programa Nacional de Imunização do Ministério da Saúde introduziu uma vacina monovalente contra o rotavírus visando à redução da prevalência das rotavirose. Com o objetivo de verificar a ocorrência de rotavirose em crianças de 0 a 12 meses vacinadas e não vacinadas atendidas nos pronto-socorros infantis do município de Manaus no Amazonas, foram analisadas durante 13 meses (maio/2007 a maio/2008), um total de 294 amostras de fezes diarreicas 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 da Polimerase em Cadeia com Transcriptase Reversa). Por meio do método da EGPA pode-se observar uma positividade de 9,5% das amostras para rotavírus humano, sendo que destas amostras, 36% eram de crianças vacinadas contra rotavírus. Todas as amostras positivas na EGPA para rotavírus humano foram tipadas 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 tipagem foi detectado o genótipo G em 42,9% das amostras positivas para rotavírus com detecção apenas do genótipo G2 e o genótipo P foi detectado em 94% das amostras positivas para rotavírus com aparecimento apenas do genótipo P[4]. As combinações dos genótipos G e P apareceram em 50% das amostras positivas para G e P, sendo todas da combinação G2P[4]. Foi observado que 17% das amostras positivas para o genótipo G e 0,6% das amostras positivas para o genótipo P não apresentaram características de nenhum dos genótipos G e P pesquisados. O número de amostras positivas para rotavírus humano foi semelhante tanto em crianças do sexo masculino quanto em crianças do sexo feminino, sendo que estas amostras predominaram em crianças de 7 a 12 meses. As amostras positivas para rotavírus humano, assim como para os genótipos G e P foram encontradas em todos os meses do estudo, com exceção de agosto de 2007 e março de 2008. A vacinação reduz a incidência de rotavírus humano em crianças que tomaram as duas doses da vacina, porém a emergência do genótipo G2P[4] observada neste estudo pode não estar associada à vacina.

Palavras chave: Doença diarreica, Rotavírus, RT-PCR, Vacina.

ABSTRACT

Human rotavirus constitutes one of the most important causes of diarrheic disease in children less than five years in the whole world. In 2006, the National Program of Immunization of Health Minister introduced a monovalent vaccine against rotavirus objecting the reduction of prevalence of rotaviruses. With the object of verifying the occurrence of genotypes of human rotavirus in children of 0 the 12 months vaccinated and non vaccinated residents in the city of Manaus in Amazon, had been analyzed during a year (may/2007 – may/2008), a total of 294 feces diarrheic samples that had been colleted of children attended hospital of children in the city of Manaus. This analyzes was carried through by the detention of the viral genome through the techniques of PAGE (Polyacrilamide Gel Eletrophoresis) and RT-PCR (Reverse transcription Polymerase Chain Reaction). Through the PAGE method can be observed a positivity of 9.5% of the human rotavirus samples, and of these samples 36% were of vaccinated children against rotavirus. All of the positive samples of human rotavirus had been typed 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] e P[10]). By the typing, it was detected genotype G in 42.9% of the positive samples for rotavirus with detection only of genotype G2 and genotype P was detected in 94% of positive samples with detection only of P[4]. The combinations of genotypes G and P appeared in 50% of the positive samples for G and P, and all of these combinations were G2P[4]. It was observed that 17% of the positive samples for genotype G and 0,6% of the positive sample for genotype P had not presented characteristics for none of searched genotypes G and P. The number of positive samples for human rotavirus 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 with age between 7 and 12 months. The positive samples of human rotavirus had been found in every months of had lasted the study with exception of august of 2007 and march of 2008. The vaccination reduce the human rotavirus incidence in children that had been take the two doses of vaccine, perhaps the emergency of the genotype G2P[4] observed in this study could not be associated to the vaccine.

Key-words: diarrheic disease, Rotavirus, RT-PCR, Vaccine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | Estrutura do rotavírus..... | 12 |
| Figura 2 | Distribuição global estimada de óbitos por rotavírus..... | 14 |
| Figura 3 | Cadeia de transmissão predominante na rotavirose..... | 16 |
| Figura 4 | A vacina monovalente (RotaRix®) e a vacina pentavalente (RotaTeq®)..... | 24 |
| Figura 5 | Amostras positivas para rotavírus em fezes diarréicas de crianças de 0 a 12 meses vacinadas e não vacinadas contra rotavírus detectadas na Eletroforese em gel de Poliacrilamida em Manaus-AM..... | 44 |
| Figura 6 | Foto de gel de agarose com amostras positivas para rotavírus genótipo G (VP7)..... | 52 |
| Figura 7 | Foto de gel de agarose com amostras positivas para rotavírus genótipo P (VP4)..... | 52 |
| Gráfico 1 | Positividade para rotavírus humanos em amostras de fezes diarréicas coletadas de crianças de 0 a 12 meses na cidade de Manaus-AM, de maio de 2007 a maio de 2008..... | 45 |
| Gráfico 2 | Distribuição das amostras positivas para rotavírus humano em fezes diarréicas de crianças vacinadas e não vacinadas contra rotavírus na cidade de Manaus-AM..... | 46 |
| Gráfico 3 | Percentual de amostras positivas para rotavírus humano em crianças de 0 a 12 meses do sexo masculino e feminino em Manaus-AM..... | 48 |
| Gráfico 4 | Positividade com relação à faixa etária das amostras de fezes diarréicas de crianças de 0 a 12 meses vacinadas e não vacinadas contra rotavírus em Manaus-AM..... | 49 |
| Gráfico 5 | Prevalências das amostras de fezes positivas para rotavírus humano distribuídas conforme o mês de ocorrência no período de maio de 2007 e maio de 2008 em Manaus, Amazonas..... | 50 |
| Gráfico 6 | Distribuição da positividade dos genótipos P e G e das combinações P e G em amostras de fezes positivas para rotavírus humano de crianças de 0 a 12 meses em Manaus, Amazonas..... | 55 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabela 1 | “Pool de primers” para definição dos genótipos P..... | 42 |
| Tabela 2 | “Pool de primers” para definição dos genótipos G..... | 42 |
| Tabela 3 | Prevalências para amostras de fezes diarréicas de crianças de 0 a 12 meses vacinadas e não vacinadas na cidade de Manaus, AM..... | 47 |
| Tabela 4 | Distribuição mensal das prevalências entre as crianças vacinadas e não vacinadas no período de maio de 2007 e maio de 2008 em Manaus, Amazonas..... | 51 |
| Tabela 5 | Positividade e Negatividade para os genótipos P e G em amostras de fezes diarréicas de crianças de 0 a 12 meses em Manaus, AM..... | 54 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|--------|---|
| – | Menos |
| % | Porcentagem |
| + | Mais |
| μL | Microlitro |
| μM | Micromol |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| AM | Amazonas |
| RNA | Ácido Ribonucléico |
| bp | Pares de Base |
| CDC | Centers for Diseases Control and Prevention |
| cDNA | DNA complementar |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| CN | Controle Negativo |
| CPCS | Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde |
| DNase | Desoxirribonuclease |
| dsRNA | Double Straind Ribonucleic Acid |
| dTTP | Deoxithymidine triphosphate |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EGPA | Eletroforese em Gel de Poliacrilamida |
| ELISA | Enzyme-Linked-immunosorbent Assay |
| FAPEAM | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas |
| FDA | <i>Food and Drug Administration of United States of America</i> |
| g | Força gravitacional |
| HCl | Ácido Clorídrico |
| HPSC | Hospital e Pronto Socorro da Criança |
| ICAM | Instituto da Criança do Amazonas |
| IgA | Imunoglobulina A |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgM | Imunoglobulina M |
| INPA | Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas |

| | |
|-------------------------|--|
| KCl | Cloreto de Potássio |
| M | Molar |
| mA | Mili Ampère |
| mg | Miligrama |
| MgCl₂ | Cloreto de Magnésio |
| Min. | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| MMDA | Monitorização das Doenças Diarréicas agudas |
| MS | Ministério da Saúde |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| NaOH | Hidróxido de Sódio |
| nm | Nanômetro |
| NPS | Non Structural Protein |
| °C | Graus Centígrados |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| PNI | Programa Nacional de Imunização |
| RNase | Ribonuclease |
| RT-PCR | Reação em Cadeia da Polimerase associada à reação da transcriptase reversa |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio |
| SVS | Secretaria de Vigilância em Saúde |
| TEMED | Tetrametilenodiamina |
| TRIS | Hidroximetil-aminometano |
| U | Unidade |
| UFAM | Universidade Federal do Amazonas |
| USA | United States of America |
| UV | Ultravioleta |
| V | Volts |
| VP | Viral Protein |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 1.1. A doença diarréica..... | 15 |
| 1.2. Histórico..... | 16 |
| 1.3. Rotavirose..... | 17 |
| 1.4. Características Morfológicas do Rotavírus..... | 17 |
| 1.5. Epidemiologia..... | 19 |
| 1.6. Patogenia..... | 22 |
| 1.7. Manifestações Clínicas..... | 24 |
| 1.8. Diagnóstico clínico e laboratorial..... | 25 |
| 1.9. Tratamento..... | 27 |
| 1.10. Imunidade..... | 27 |
| 1.11. Vacina contra rotavírus..... | 29 |
| 1.12. Prevenção e controle..... | 31 |
| 2. OBJETIVOS..... | 32 |
| 2.1. Geral..... | 32 |
| 2.2. Específicos..... | 32 |
| 3. METODOLOGIA..... | 33 |
| 3.1. Modelo de Estudo..... | 33 |
| 3.2. Universo de Estudo..... | 33 |
| 3.2.1. Participantes..... | 33 |
| 3.2.2. Amostras..... | 33 |
| 3.2.3. Critérios de Inclusão e/ou exclusão..... | 33 |
| 3.3. Coleta das amostras fecais..... | 34 |
| 3.4. Método Laboratorial..... | 35 |
| 3.4.1. Detecção do genoma viral do Rotavírus pela Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (dsRNA-EGPA)..... | 35 |
| 3.4.1.1. Extração do genoma viral..... | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4.1.2. Preparo do gel de poliacrilamida..... | 36 |
| 3.4.1.3. Coloração do gel com nitrato de prata..... | 37 |
| 3.4.1.4. Leitura e fotografia do gel..... | 38 |
| 3.4.2. Caracterização molecular das amostras de rotavírus em genótipos P (VP4) e G (VP7) por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)..... | 38 |
| 3.4.2.1. Extração do ácido ribonucléico (RNA) viral para RT-PCR..... | 39 |
| 3.4.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase associada à reação da Transcriptase reversa (RT-PCR)..... | 39 |
| 3.4.2.3. Reação de PCR para genotipagem viral (NESTED)..... | 40 |
| 3.4.2.4. Iniciadores (<i>Primers</i>) utilizados..... | 41 |
| 3.4.2.5. Análise dos genótipos por Eletroforese em Gel de Agarose..... | 42 |
| 3.5. Análise dos resultados..... | 43 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 44 |
| 4.1. Positividade para rotavírus humanos..... | 44 |
| 4.2. Positividade para os genótipos P e G de rotavírus humanos..... | 51 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 60 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 62 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. A doença diarréica

A doença diarréica, também conhecida como gastroenterite, é uma das doenças mais comuns em crianças em todo o mundo. Em países desenvolvidos, assim como no Brasil, sua importância está relacionada ao impacto da doença na população, traduzido pelos seus danos à saúde, afetando o desenvolvimento infantil, bem como à sociedade pelos custos gerados pela demanda aos serviços médicos, atendimento ambulatorial, pronto atendimento, hospitalizações (custos diretos) e as perdas de dias de trabalhos, de escola, gastos com medicamentos, transportes, etc. (custos indiretos). Adicionalmente, o conhecimento da interação de diarréia persistente e má nutrição como causa de mortalidade tem reforçado a necessidade de desenvolvimento de programas de intervenção (VRANJAC, 2004).

A etiologia das diarréias pode envolver vários agentes como vírus, bactérias e parasitas, sendo virais as de maior relevância epidemiológica, pois além de serem as causadoras do maior número de casos de doenças diarréicas, podem também ocasionar os casos com quadros clínicos severos, principalmente quando associados à desnutrição (CDC, 2006). A doença diarréica aguda de origem virótica que afeta crianças nos primeiros anos de vida pode ser causada por diferentes tipos de vírus, entre eles os Norovírus, os Adenovírus, Astrovírus e Rotavírus (MOYO et al., 2007).

Caracterizadas por inflamação no estômago e nos intestinos delgado e grosso, as gastroenterites virais podem ser consideradas como infecções causadas por vários tipos de vírus, dentre eles pode-se citar os Calicivirus, os Adenovírus, os Norwalk, os Astrovírus e os Rotavírus, sendo que, dentre esses, o rotavírus é reconhecidamente o agente mais importante associado às doenças diarréicas (CDC, 2006). Está associado a 30,0-50,0% dos casos de diarréia grave e aproximadamente com um terço das hospitalizações por diarréia, sendo responsável por 800.000 mortes em todo o mundo (VRANJAC, 2004).

1.2. Histórico

O primeiro relato de diarreia aguda em humanos, provavelmente causada por rotavírus, foi realizado em 1943 por Light & Hodes (apud GIGLIO et al., 1992), 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 (GIGLIO et al., 1992).

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 analisando biópsias de tecido duodenal de crianças com diarreia aguda em microscópio eletrônico, e encontrou uma infestação de vírus de formato circular nas células epiteliais da parede do intestino (GLASS, 2006). Na mesma década, Flewett e colaboradores (apud BREVIGLIERI, 1979), examinando extrato de fezes diarréicas infantis por microscopia eletrônica, identificaram partículas virais com capsídio de dupla camada e com borda claramente definida (BREVIGLIERI, 1979).

Houve uma polêmica inicial quanto ao nome que deveria ser dado ao novo vírus, pois Bishop e colaboradores (apud GIGLIO et al., 1991) sugeriram o nome Orbivírus devido à morfologia do vírus. Já Flewett e colaboradores (apud GIGLIO et al., 1991) sugeriram Rotavírus, termo derivado do latim “rota” que significa roda, tendo como base o aspecto do vírus. Davidson e colaboradores (apud GIGLIO et al., 1991) sugeriram Duovírus, considerando o local onde o vírus foi encontrado pela primeira vez em humano, ou seja, na mucosa do duodeno. Finalmente, em 1978, o comitê de taxonomia dos vírus, no 4º. Congresso Internacional de Virologia definiu o termo Rotavírus (GIGLIO 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 – PA. Este estudo, utilizando a microscopia eletrônica, propiciou a detecção de rotavírus em espécies fecais em 16% dos

pacientes. Tais achados representaram o marco inicial de inúmeros outros estudos no país (LINHARES, 2000).

1.3. Rotavirose

A infecção por rotavírus se manifesta após um período de incubação de até 48h e permanece no organismo de três a oito dias. Os principais sinais e sintomas da doença são vômitos acompanhados de fezes líquidas ou semi-líquidas. O vômito é o primeiro sinal da doença a se manifestar e quase sempre vem acompanhado de febre alta, na seqüência surge a diarréia e as dores abdominais (FERNANDES et al., 2000).

Os rotavírus têm como sua principal forma de transmissão a via fecal-oral e por serem vírus considerados relativamente resistentes aos desinfetantes comuns, podem manter sua infecciosidade por vários meses entre a temperatura de 4 °C e 20 °C. Acredita-se que pessoas infectadas por rotavírus podem excretar até um trilhão de partículas em 1 mL de fezes, e como a carga viral necessária para infectar o homem é muito baixa (aproximadamente 10 partículas), a chance de surto da doença, principalmente em comunidades fechadas como creches e berçários, pode ser bastante comum (BRICKS, 2005).

1.4. Características Morfológicas do Rotavírus

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

Os Rotavírus são vírus não-envelopado e possuem uma tripla camada protéica concêntrica que envolve seu genoma, o qual é composto por 11 segmentos RNA de fita dupla (dsRNA) que codificam 12 proteínas, estas são divididas em seis proteínas estruturais (VP1-VP4, VP6 e VP7) e seis não-estruturais (NSP1-NSP6) (LIMA, 2007).

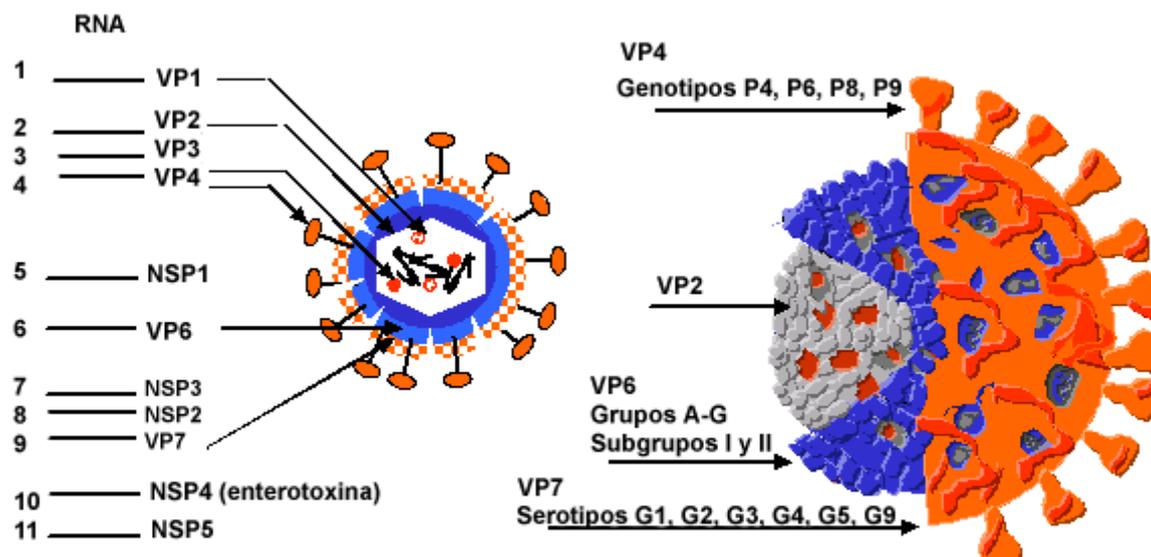


Figura 1 – Estrutura do rotavírus (Adaptado de ESTES, 1996).

O capsídeo interno (camada intermediária) é constituído pela 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 externo é composto pelas proteínas VP4 e VP7 que formam a base do sistema de classificação para os tipos P (VP4) e G (VP7). A proteína VP7 apresenta o antígeno de neutralização principal que é caracterizado por sorologia e técnicas moleculares. Atualmente, são conhecidos 15 sorotipos G com uma boa correlação entre sorologia e as classificações do genoma. A proteína VP4 também apresenta o antígeno de neutralização, porém, a sua correlação entre 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 VP7 recebe a designação G por ser uma glicoproteína, sendo o sorotipo e o genótipo expressos por um único elemento (ex. G1). O sorotipo VP4 recebe a designação P por ser sensível à protease e é expresso por números e, em alguns casos, por letras, sendo o genótipo designado entre colchetes (ex. P1A[8]) (COLUCHI et al., 2002).

A maioria dos sorotipos de G e P é compartilhada entre humanos e animais, porém, somente 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 encontrados em humanos (COLUCHI et al., 2002). Dentre os sorotipos G, de G1 a G4 são os mais frequentemente encontrados em todo o mundo e para os quais as vacinas estão sendo desenvolvidas (CDC, 2006) e os genótipos P (P[1], P[3], P[6], P[8], P[9], P[11] e P[14]) são, também conhecidos, por causarem infecção em humanos (BÁNYAI et al., 2004).

1.5. Epidemiologia

Anualmente estima-se a ocorrência mundial de aproximadamente 130 milhões de casos de diarreia provocada pelo rotavírus, tendo como consequência 500 mil mortes de crianças abaixo de cinco anos. Acredita-se que, em países subdesenvolvidos, bem como naqueles em desenvolvimento, 1.200 crianças morrem diariamente da doença (VRANJAC, 2004). A figura 2 representa a distribuição global de óbitos causados por rotavírus, segundo o Centers of Disease Control (2006).

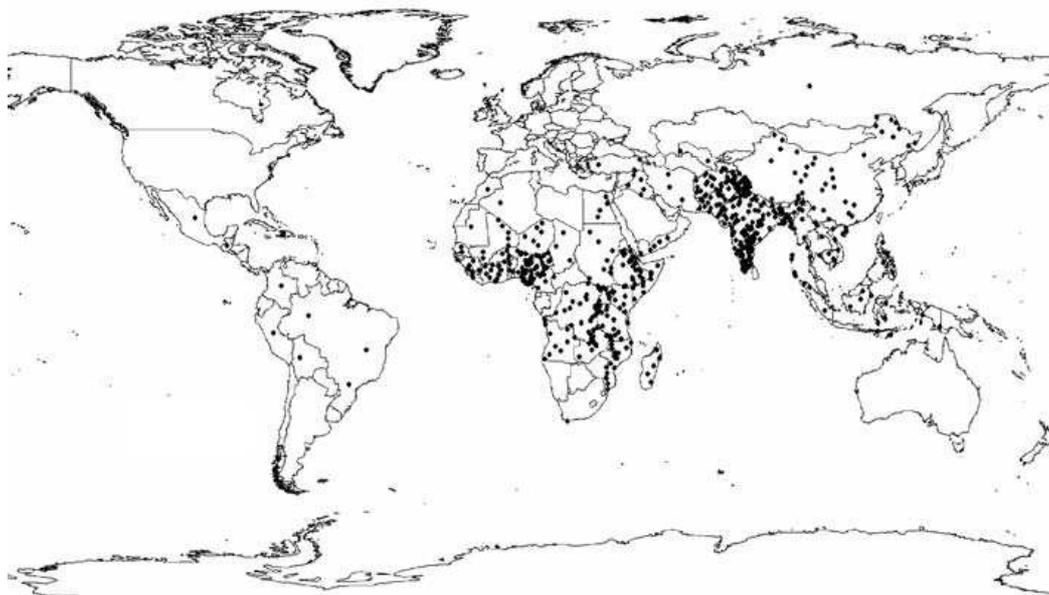


Figura 2 – Distribuição global estimada de óbitos por rotavírus (CDC, 2006).

Somente no Brasil dados do MDDA/MS mostram que durante o ano de 2004 foram notificados em todo território nacional aproximadamente 2.400.000 casos da rotavirose (MS, 2006).

Nas regiões de clima temperado verificou-se que as diarreias por rotavírus ocorrem mais freqüentemente durante os meses de inverno, enquanto que naquelas tropicais não se configura um típico perfil sazonal (KAPIKIAN; CHANOCK, 1990).

A maioria dos estudos epidemiológicos encontrados no Brasil foram realizados no norte e no sudeste do país, assim os dados equivalentes a outras regiões como sul e nordeste são escassos, porém os estudos existentes mostram taxas que variam de 12 a 42% de doença diarreica por rotavírus em período anterior à implantação da vacina (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 diarréica em menores de cinco anos, que são relacionadas à doença diarréica 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 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Na região amazônica, os estudos sobre rotavírus iniciaram em 1977, na mesma época da descoberta deste patógeno em âmbito nacional, a partir do qual se procurou avaliar a magnitude epidemiológica do problema na região (LINHARES et al., 1994), sendo que os estudos realizados na década de 90 na região demonstram que os casos de doença diarréica 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 detectada a presença de rotavírus em 41,1% das amostras de material fecal de crianças menores de cinco anos residentes no município de Manaus (COIRO et al., 1983). Costa e colaboradores (1997), estudando os genótipos P e G dos rotavírus humanos na cidade de Manaus, encontraram uma positividade para rotavírus de 31%.

No mesmo município, Rocha (2003) em sua pesquisa de dissertação de mestrado sobre os aspectos epidemiológicos e clínicos da doença, analisou pelo mesmo método de Costa, 380 amostras fecais, encontrando 46% das amostras positivas para rotavírus.

1.6. Patogenia

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 (susceptível) reinicia a cadeia de transmissão, e esta criança se torna 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 o quarto dia do início dos sintomas, porém os vírus já estão presentes nas fezes desde o início das manifestações clínicas e até 10 a 12 dias após o término. Na figura 3 é demonstrada a cadeia de transmissão do rotavírus (RIBEIRO, 2006).

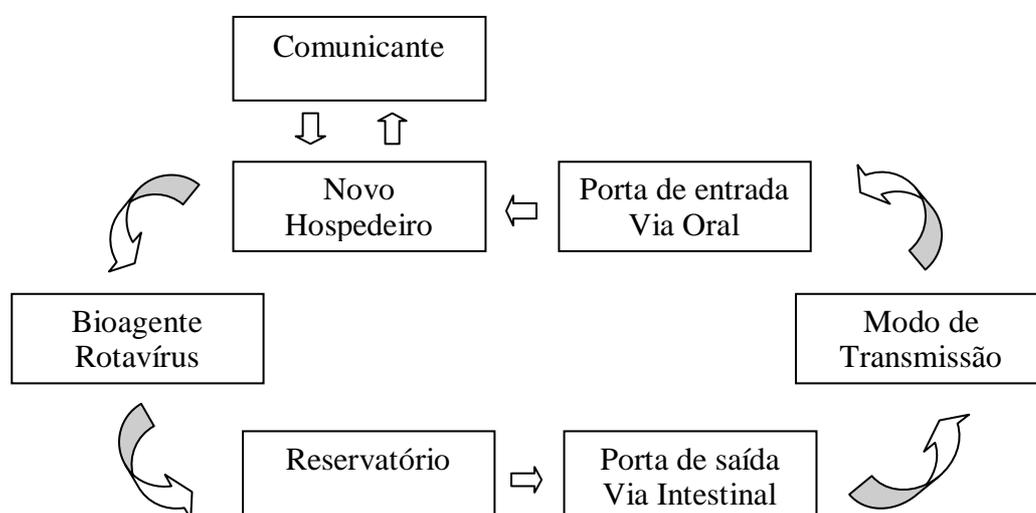


Figura 3 – Cadeia de transmissão predominante na rotavirose (Modificado de RIBEIRO, 2006).

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 são então, fracionadas pelas enzimas pancreáticas, tripsina ou elastina em duas proteínas menores, as VP5 e VP8. Após este fracionamento da VP4, o vírus adere às células do epitélio intestinal, ocasionando 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 ARN do vírus no sangue e em alguns órgãos de crianças que tiveram infecção grave por rotavírus (BRICKS, 2005).

Após a infecção dos enterócitos pelas partículas virais, observa-se redução da Na/K ATPase, responsável pelo processo de absorção intestinal do Na⁺ acoplado a glicose, havendo redução da absorção deste assim como da água. Os níveis de AMP cíclico se mantêm inalterados, daí excluir-se o mecanismo secretório no contexto fisiopatológico das diarreias por rotavírus. Há também redução da atividade inerente às dissacaridases, principalmente da lactase, comprometendo o desdobramento dos dissacarídeos e sua absorção, promovendo um aumento da osmolaridade do lúmen intestinal, e conseqüentemente, aumento do afluxo de água e eletrólitos ao nível do intestino delgado alto. O açúcar não absorvido pode sofrer ação de bactérias que colonizam as porções mais distais do intestino, resultando na eliminação de fezes com pH ácido, resultando na diarreia de natureza osmótica (PEREIRA et al., 1994). Isto pode determinar um aumento na secreção de água e eletrólitos no lúmen intestinal, causando diarreia com desequilíbrio hidroeletrolítico, condição esta, que pode levar à morte (FERNANDES, 2000). O ciclo viral nos enterócitos está ilustrado na figura 4.

Até o momento existem poucos estudos sobre a ação patogênica dos rotavírus em seres humanos, mas a proteína não estrutural NSP4 parece desempenhar um papel importante no desencadeamento da diarreia. Em animais infectados por rotavírus experimentalmente, a NSP4 (Not Structural Protein) atua de forma semelhante à enterotoxina de *Escherichia coli*, disparando um sinal de transdução que leva ao aumento do cálcio intercelular e à excreção do cloro (BRICKS, 2005).

1.7. Manifestações Clínicas

As principais manifestações clínicas são vômitos, diarreia aquosa e febre. Geralmente os vômitos são mais intensos e mais duradouros que nas diarreias agudas provocadas por outros patógenos. Estudos mostram uma média de 2,6 dias de duração da êmese quando há positividade para rotavírus contra 0,9 dias quando há negatividade do mesmo. (GIGLIO, 1991).

A diarreia geralmente é aquosa, tem caráter explosivo sem conteúdo de sangue ou pus ocorrendo muco em 25% dos casos. Pode ser bastante profunda podendo levar à desidratação e conseqüente aumento da mortalidade. A duração é variável, 4 a 8 dias, podendo tornar-se protraída mesmo em indivíduos imunocompetentes. Verifica-se que aproximadamente 50% das crianças internadas por infecção diarreica por rotavírus apresentam desidratação de 2º grau, que podem durar de quatro a oito dias. No entanto, a febre precede o início da diarreia em 30 a 50%, podendo variar de 38 °C a 41°C com uma média de duração de 2 a 3 dias (GIGLIO, 1991; LINHARES et al., 1997).

A avaliação do nível de desidratação é essencial para sobrevivência do indivíduo. Crianças na categoria de desidratação grave estão geralmente acidóticas e requerem intervenção imediata. Clinicamente, estas crianças podem apresentar letargia ou sinais de choque (SONNEN; HENRY, 2004).

Em pacientes imunocomprometidos, os rotavírus podem desencadear quadros clínicos severos com acometimento de outros órgãos como rins, fígado e sistema nervoso central (BRICKS, 2005).

1.8. Diagnóstico clínico e laboratorial

O diagnóstico da doença diarréica por rotavírus é baseado na história e no exame físico e 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, pois quando apresentarem sangue devem ser considerados agentes bacterianos como *Shigella* sp., *E. coli*, *Salmonella* sp., *Yersinia* sp. e *Campylobacter* sp. (SONNEN; HENRY, 2004).

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

Um dos métodos de diagnóstico utilizados na detecção de partículas do vírus em fezes são as técnicas de microscopia eletrônica e a imunomicroscopia, porém, sua aplicabilidade é restrita a centros diferenciados de pesquisa científica devido a aparelhagem de alto custo e limitações de ordem operacional (LINHARES et al., 1997).

Por este motivo as pesquisas científicas evoluíram e houve o surgimento de outros métodos como imunofluorescência em mucosa duodenal, imunoeleetrosmoforese, contra-imunoeleetrosmoforese, precipitação fluorescente, eletroforese do ARN viral, imunofluorescência em fezes, radioimunoensaio e imunoensaio enzimático. Algumas dessas

técnicas se mostraram menos sensíveis que a microscopia eletrônica sendo pouco utilizadas para fins de diagnóstico (GIGLIO et al., 1991).

Técnicas de diagnóstico rápido e sensíveis na detecção dos antígenos virais mostraram-se promissoras, como por exemplo, o ELISA (Enzyme - Linked - immunosorbent Assay) (GIGLIO et al.; 1991) e o APL (Aglutinação em Partículas de Látex). Esta última oferece boa sensibilidade e é muito útil para testes de triagem por ser rápida e de fácil execução sendo, atualmente, o mais recomendado em hospitais pediátricos (SILVEIRA, 2005).

Para detecção do genoma viral pode-se utilizar a EGPA (Eletrofore em gel de policrilamida), a RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase associada à reação da transcriptase reversa) e a hibridação de ácido nucléico combinado com “norten blot” (LINHARES et al., 1997; ROCHA, 2003).

A EGPA é uma técnica que apresenta sensibilidade da ordem de 97,14% quando comparada ao ensaio imunoenzimático. Dada a sua simplicidade, a eletroforese em gel de poliácridamida permite um diagnóstico etiológico rápido do quadro diarréico, tornando, assim, possível interromper a 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., 1990a).

A RT-PCR é utilizada para identificação da sucessão de nucleotídeos comuns aos genótipos P e G. Os genótipos são identificados pela diferença no peso molecular dos fragmentos de ADN (ácido desoxirribonucléico) sintetizados na presença de iniciadores específicos para cada genótipo e, posteriormente, são separados por meio da eletroforese em gel de agarose (GOUVEA et al., 1990).

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

1.9. Tratamento

O tratamento é o mesmo instituído para as doenças diarreicas agudas. É importante a reidratação oral e/ou parenteral (quando a reposição de fluidos e eletrólitos não for suficiente), para evitar as complicações (desidratação grave e distúrbios hidreletrolíticos) (MS, 2005).

O uso de antimicrobianos e antidiarréicos não é recomendado e deve-se manter a dieta habitual do doente. As fórmulas lácteas devem ser diluídas em curto período de tempo, para não agravar o estado nutricional, ou de casos mais severos que cursam com intolerância à lactose (sinais clínicos e laboratoriais evidentes) deve-se preferir fórmulas isentas desse dissacarídeo (LINHARES et al., 1997).

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 (“natremia” - Teor de sódio no sangue) devem ser reidratados lentamente devido ao déficit de água livre o sódio (SONNEN; HENRY, 2004).

As rotaviroses geralmente evoluem para a cura espontânea (MS, 2005).

1.10. Imunidade

As informações relativas à resposta imune nas infecções por rotavírus referente à prevalência de anticorpos e à dinâmica de aquisição da imunidade ainda são limitadas (LINHARES, 2000), embora se acredite que até 4-5 anos, 70% das crianças adquiriram imunidade natural para a doença (KALE, 2004).

Os resultados disponíveis, presentemente, assinalam que, no curso de uma infecção primária, as imunoglobulinas da classe IgM aparecem precocemente, sendo detectadas já na

fase aguda da doença. As imunoglobulinas IgG e IgA emergem subseqüentemente, alcançando níveis elevados de concentração sérica após 2 a 4 semanas do início da infecção; a primeira se estabelece em níveis relativamente estacionários por um longo período, enquanto que a segunda tende a declinar gradativamente (DAVIDSON et al., 1977)

Estudos recentes mostram que as rotaviroses induzem uma secreção de IgA pela mucosa intestinal, que por razões desconhecidas, não persistem na circulação. Crescentes títulos séricos de IgG rotavírus-específica, IgG e IgA são também observadas após infecção. Algumas das IgAs séricas apresentam um componente secretor sugerindo que este é derivado do intestino. Isto pode explicar porque os níveis séricos de IgA rotavírus-específicas proporcionam uma eficaz proteção contra doença (ANGEL et al., 2007).

A sorotipo-especificidade da resposta imune nas infecções naturais é definida pelas proteínas VP4 e VP7 e, nesse sentido, foram produzidas vacinas que incorporam sorotipos e genótipos do rotavírus humanos considerados mais importantes (RAMACHANDRAN et al., 1998). Entretanto, o caráter heterotípico na imunidade por rotavírus tem sido demonstrado amplamente (LOURENÇO et al., 1981). Por essa razão é que, nas reinfecções, em geral estão envolvidos sorotipos diversos. Nesse sentido, cabe enfatizar recomendações da OMS, no sentido de que uma vacina contra o agente em questão deva, necessariamente, proteger contra os quatro sorotipos epidemiologicamente importantes.

O papel protetor do leite materno tem sido sustentado por alguns autores. A IgA láctea, resistente à ação proteolítica das enzimas intestinais, exerceria ação neutralizante viral a nível de mucosa intestinal. A esse fator imune se associariam componentes com atividade antiviral definida como alfa-1-antitripsina e certos lipídeos (JAYASHREE et al., 1988).

1.11. Vacina contra rotavírus

As vacinas contra rotavírus vêm sendo testadas desde 1983, quando Francis André da atual GlaxoSmithKline, desenvolveu na Bélgica uma vacina (RotaShield®) monovalente produzida com uma cepa bovina. Esta vacina foi retirada do mercado em 1999, após ser detectada uma associação entre a sua utilização e um tipo raro de interssuscepção intestinal (GLASS, 2006).

Com a retirada da RotaShield 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, a 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 um único sorotipo que é o G1(P8) da cepa RIX4414 (MS, 2006).

Estudos foram realizados na América Latina e Europa e comprovaram a eficácia da RotaRix® na prevenção da doença diarréica severa por rotavírus e, com base nesses estudos, a vacina foi introduzida no PNI/MS (Programa Nacional de Imunização) em março de 2006, com administração de duas doses com intervalo de dois meses entre a primeira e a segunda (GURGEL et al., 2007).

Outras vacinas vêm sendo desenvolvidas, como por exemplo, a vacina pentavalente RotaTeq® com cinco cepas humanas e bovinas reagrupadas desenvolvida pela MercksharpDome, que pode conferir proteção contra as cinco cepas humanas mais comuns do rotavírus, porém, a indústria concentrou a sua distribuição somente nos EUA (Figura 4). No Brasil, o Instituto Butantã em São Paulo está elaborando uma vacina pentavalente, com foco nos sorotipos mais comuns no Brasil. Além da vantagem de fornecer um produto mais específico para a realidade nacional, o Instituto Butantã tem como meta a redução dos custos,

visto que para cada dose da vacina RotaRix® gasta-se sete dólares, enquanto que a produzida no Brasil deverá custar por volta de um dólar (GLASS, 2006).

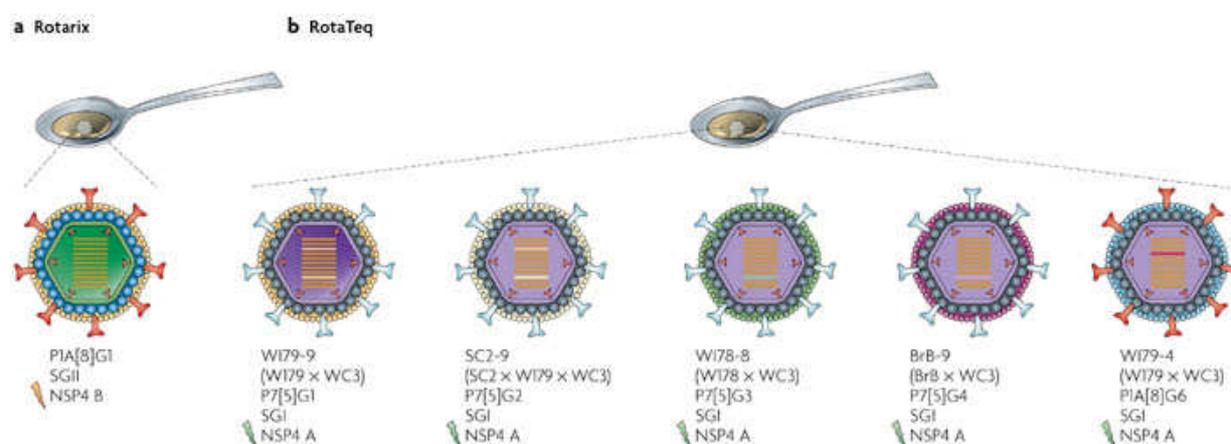


Figura 4 – A vacina monovalente (RotaRix) e a vacina pentavalente (RotaTaq) (ANGEL et al., 2007).

Segundo o CDC (2006) as vacinas contra rotavírus podem diminuir consideravelmente os casos severos de diarreia por rotavírus em todo o mundo, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, porém, os aspectos epidemiológicos da doença, bem como a própria utilização de uma vacina contra a mesma, são merecedores de estudos que possam melhor direcionar as medidas de prevenção e controle dessa patologia.

1.12. Prevenção e controle

Prevalece amplo consenso de que o efetivo controle das gastroenterites por rotavírus se condiciona ao advento de uma vacina eficaz para uso corrente ao longo do primeiro semestre de vida (BREESE *et al.*, 1999). Tal asserção se fundamenta na singularidade que permeia a

epidemiologia das infecções por esses vírus, evidenciada pelo fato de as taxas de incidência da doença nos países desenvolvidos e naqueles em desenvolvimento serem comparáveis. Deduz-se, por conseguinte, que eventuais intervenções na esfera da saúde pública, como o acesso amplo à água potável e a implementação de medidas visando ao saneamento básico, resultarão em impacto inexpressivo no que concerne à morbidade associada às diarreias por rotavírus (BRESEE et al., 1999).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a ocorrência de doenças diarréicas por rotavírus em crianças de 0 a 12 meses atendidas em pronto-socorros infantis do município de Manaus - AM por um período de 13 meses, entre 2007 e 2008.

2.2 Específicos

2.2.1. Verificar a ocorrência de infecção diarréica em crianças de 0 a 12 meses atendidas em Prontos Socorros infantis do município de Manaus que receberam e que não receberam vacina contra rotavírus;

2.2.2. Determinar os sorogrupos das amostras positivas para rotavírus na EGPA por meio da Reação em Cadeia da Polimerase.

3. METODOLOGIA

3.1. Modelo de Estudo

Para avaliação da ocorrência de infecções diarreicas por rotavírus em crianças de 0 a 12 meses de idade atendidas nos pronto-socorros do município de Manaus, optou-se por um estudo prospectivo, não probabilístico causal programado para 13 meses de duração, compreendido entre os meses de maio/2007 a maio/2008.

3.2. Universo de Estudo

3.2.1. Participantes

Crianças de 0 a 12 meses de idade, domiciliadas em Manaus-AM, de ambos os sexos, com diarreia aguda, hospitalizadas nos HPSC Zona Sul, PSC da Zona Leste e HPSC Zona Oeste.

3.2.2. Amostras

Fezes diarreicas líquidas ou semi-líquidas de crianças de 0 a 12 meses de idade hospitalizadas nos HPSC Zona Sul, PSC da Zona Leste e HPSC Zona Oeste do município de Manaus-AM.

3.2.3. Critérios de Inclusão e/ou exclusão

Serão incluídas na pesquisa as crianças que preencham os seguintes critérios:

- Crianças de ambos os sexos na faixa etária de 0 a 12 meses com diarreia aguda (três ou mais episódios) com duração de 7 a 10 dias, não relacionada a outras patologias como intoxicação alimentar ou infecção hospitalar.
- Crianças hospitalizadas no HPSC Zona Sul, HPSC Zona Leste e HPSC Zona Oeste;

- Crianças que não tenham feito uso de antimicrobianos nos últimos sete dias;
- Crianças que não estejam em fase inicial de mudança no uso de leite.

Serão excluídas da pesquisa as crianças que preencherem os seguintes critérios:

- Crianças com infecção diarréica por intoxicação alimentar;
- Crianças com infecção diarréica com idade superior a 11 meses e 29 dias;
- Crianças com 72h de internação hospitalar;
- Crianças de origem indígena.

3.3. Coleta das amostras fecais

As coletas das amostras fecais tiveram início em maio de 2007 após a aprovação do projeto pelo CEP-INPA (Comitê de Ética em Pesquisa – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), N. 236/2003 para avaliação da epidemiologia molecular das infecções por rotavírus na população infantil da cidade de Manaus/AM após a introdução da vacina no PNI/MS (Programa Nacional de Imunização do Ministério da Saúde) em 2006, e terminaram em maio de 2008, compondo um total de 294 amostras coletadas.

As amostras de fezes foram coletadas diariamente de crianças do sexo masculino e feminino, na faixa etária de 0 a 12 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 situados no município de Manaus, AM.

Por ocasião da coleta, os pais ou o responsável pela criança foram esclarecidos sobre os objetivos do estudo, riscos ou possíveis danos que poderiam vir a ocorrer com as crianças caso fossem incluídas no estudo, havendo concordância com os termos, o responsável 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

obtidas por meio de entrevista com os pais ou responsável utilizando-se um formulário contendo perguntas objetivas.

Após a obtenção dos dados epidemiológicos procedia-se à coleta da amostra fecal por excreção espontânea. Esta era acondicionada em recipiente plástico ou de vidro esterilizado com capacidade para 10 mL e mantidas sob refrigeração de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, permanecendo nessa temperatura também no armazenamento e transporte até o laboratório de Virologia e Imunologia do INPA. No laboratório, as amostras eram numeradas e catalogadas em um banco de dados da 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 processamento pelo método da EGPA (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida) para a detecção de Rotavírus.

3.4. Método Laboratorial

3.4.1. Detecção do genoma viral do Rotavírus pela Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (dsRNA-EGPA)

A pesquisa de rotavírus foi feita pela análise de ácido ribonucléico (ARN) por meio da Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA), segundo técnica descrita por Laemmli (1970), com algumas modificações citadas por Pereira *et al.*, (1994) seguindo o 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 tubos falcon de 15 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 2.500 g por 30 minutos, obtendo-se um clarificado das fezes. Do sobrenadante (clarificado) foi retirada uma alíquota de 500µL e colocada em microtubo de 1,5 mL para a extração do RNA viral e o restante foi armazenado em tubos de hemólise a – 20 °C.

A extração iniciou-se com acréscimo de 80µL de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 10% aos 500 µL de clarificado no microtubo de 1,5 mL. Após forte agitação, as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Passado o tempo, as amostras foram retiradas do banho-maria e adicionou-se 300µL de fenol e 300µL de clorofórmio. Os tubos foram incubados em temperatura ambiente com agitações periódicas de cinco em cinco minutos por 15 minutos e posteriormente foram centrifugados a 2.500g por 15 minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para microtubos previamente identificados. Adicionou-se 100µL de Cloreto de Sódio a 20%, homogeneizou-se por inversão de microtubos, em seguida adicionou-se 900 µL de etanol P.A. e incubou-se a – 20 °C por 18 horas para ocorrer a precipitação do RNA viral.

Após este período, os microtubos foram centrifugados a 13.000g por 30 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos foram secos com os tubos em posição invertida sobre papel filtro em temperatura ambiente. Depois de secos, os sedimentos foram ressuspensos em 30µL de solução dissociadora (Tris-base 0,0625M pH 6,8, uréia 5M, SDS 3%, 2-Mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 1%). Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria a 56 °C por 15 minutos.

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 recipientes de gel,

preparados com duas placas de vidro separadas entre si por espaçadores de plástico 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 3 mM pH 8,8, persulfato de amônia 0,03 mM e tetrametilenodiamina (TEMED) 0,2%, que foi imediatamente adicionado à placa até 0,4 cm abaixo da extremidade inferior do pente. Sobre a superfície, quando necessário, adicionava-se 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 polimerizado, colocando-se o pente para a formação dos canais para a aplicação das amostras preparadas como descrito anteriormente.

Após a completa polimerização do gel, o espaçador inferior foi retirado e a placa foi fixada na cuba de eletroforese, de forma que o nível mínimo das placas (pente) ficou situado a aproximadamente 2-3 cm do nível do reservatório superior da cuba. Os contatos entre as placas e o reservatório superior foram vedados com ágar 2% e o tampão de corrida (Tris 0,01 M, 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 10 μ L de cada amostra em cada canal do gel. Depois de todas as amostras colocadas, a fonte de energia foi ligada ajustando-se a corrente para 80 mA. Após a saída do corante azul de bromofenol do gel manteve-se a fonte ligada por mais metade do tempo que o corante levou para sair do gel.

3.4.1.3. Coloração do gel com nitrato de prata

O gel foi corado com nitrato de prata conforme 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, os espaçadores foram retirados e abriram-se as placas. O gel

superior (concentrador) foi descartado e o gel separador foi transferido para uma solução fixadora de etanol 10% e ácido acético 0,5% por 30 minutos. Em seguida, desprezou-se a solução fixadora, o gel foi lavado com água destilada e transferido para uma solução corante de nitrato de prata 0,01 M, por mais 30 minutos, com agitações periódicas. Desprezou-se a solução corante e lavou-se o gel duas vezes com água destilada e, em seguida acrescentou-se a solução reveladora de hidróxido de sódio (NaOH) 0,75 M e formaldeído 0,95%. Após 7-9 minutos ou com a visualização das bandas a revelação foi interrompida desprezando-se a solução reveladora e adicionando-se uma solução de ácido acético 5% por 15 minutos. Após a parada da revelação, o gel foi mantido em uma solução conservante de etanol 10% até o momento da leitura e fotografia.

3.4.1.4. Leitura e fotografia do gel

As leituras foram realizadas depositando-se o gel sobre um transiluminador de luz branca, e em seguida os géis foram fotografados com máquina fotográfica digital.

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

A determinação dos genótipos das amostras positivas previamente detectadas na EGPA foi feita por meio da Reação em Cadeia da Polimerase associada à reação da transcriptase reversa (RT-PCR) utilizando “Primers” específicos para o gene 4 (VP4) e para o gene 9 (VP7) segundo técnica descrita por Gentsh et al. (1992) e Gouvea et al. (1990, 1994a, b).

3.4.2.1. Extração do ácido ribonucléico (RNA) viral para RT-PCR

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 500µL, misturou-se 150µL do clarificado e 150µL de Trizol®. A mistura foi homogeneizada em agitador de tubo e, em seguida, foram adicionados 100µL de clorofórmio agitando-se no aparelho por 30 segundos e incubando por 5 minutos a 4 °C.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 541R) a 12.000g durante 10 minutos a 4 °C. Em seguida transferiu-se a fase superior aquosa para outro microtubo previamente identificado. O RNA viral foi precipitado por adição de igual volume de álcool isopropílico e incubado durante 10 minutos a 4 °C. Depois, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 541R) a 12.000g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante da centrifugação foi descartado e o sedimento lavado com 500µL de etanol 75% gelado, homogeneizado e centrifugado a 14.000g por 5 minutos a 4 °C. Vertendo-se rapidamente o conteúdo do tubo, obteve-se somente o sedimento. A secagem do sedimento foi feita com o tubo em posição invertida, no fluxo de ar da câmara de fluxo laminar.

Depois de seco, o RNA foi ressuscitado em 30 µL de água estéril livre de RNase e DNase e estocado a – 70 °C até o processamento.

3.4.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase associada à reação da Transcriptase reversa (RT-PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase para caracterização do genótipo P (VP4) e G (VP7), foi realizada segundo metodologia utilizada por Santos; Gouvea (1994).

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 (cDNA) 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 (Dimetilsulfóxido), depois aqueceu-se a 95 °C por 4 minutos para abrir e manter aberta a fita dupla de RNA. Após esse período, as suspensões eram imediatamente resfriadas em banho de gelo por 5 minutos e adicionados 22µL do MIX (7µL de água destilada estéril, 8µL da mistura de dioxirribonucleotídeos trifosfato – dATP, dGTP, dCTP, dTTP 1,25 mM – mais 2,5µL da solução tampão da reação 10 vezes concentrada contendo Tris-HCl 100 mM pH 9.0, KCl 500 mM, outros 2,5µL de MgCl₂ (Cloreto de magnésio) 25 mM, 1 µL da solução de “primers” contendo 20 µM de con2-con3 para amplificar todo o gene 4 e 1 µL da solução de “primers” contendo 20 µM de Beg9-End9 para amplificar todo o gene 9), foram acrescentados ainda 2 unidades da enzima transcriptase reversa (Invitrogen do Brasil) e 1,25 unidade 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 cDNA. Em seguida, os mesmos tubos eram submetidos a uma série de 30 ciclos de amplificação – 94 °C por um minuto, 42 °C por 2 minutos e 72 °C por um minuto – e uma incubação final de 72 °C por sete minutos.

3.4.2.3. Reação de PCR para genotipagem viral (NESTED)

Nesta etapa, 1µL 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-se “primers” específicos para os diferentes genótipos P (Con3, 1T-1, 2T-1, 3T-1, 4T-1 e 5T-1) e para os genótipos G (Beg9, End9, aBT1, aCT-2, aDT4, aET3 e aFT9).

Foram adicionados 21µL do MIX (7µL de água destilada estéril, 8µL da mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfato – dATP, dGTP, dCTP, dTTP 1,25 mM – 2,5µL de tampão 10 vezes concentrado contendo Tris-HCl 100 mM pH 9.0, KCl 500 mM, outros 2,5µL de MgCl₂ (Cloreto de magnésio) 25 mM, 1µL do “pool” de “primers” específico para cada genótipo) e ainda 1,25 unidades da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen do Brasil).

Os tubos foram colocados em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradiente) programado para 25 ciclos de PCR a uma incubação de 94°C por 1 minuto, 50 °C por dois minutos e 72 °C por 1 minuto e, a uma incubação de extensão final de 72 °C por 7 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], e P4[10]. Este “pool de primers” está demonstrado na tabela 1.

Para definir os genótipos G (VP7) das amostras de rotavírus, foram inicialmente utilizados “pool de primers” para genótipos G1, G2, G3, G4 e G9. Este “pool de primers” está demonstrado na tabela 2.

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

Para controle de qualidade de cada PCR foram utilizados dois controles negativos (água livre de DNase e RNase estéril) e um controle positivo (ARN preparado de uma amostra fecal positiva para rotavírus).

Tabela 1

“Pool de primers” para definição do genótipo 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 2

“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 TCC 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 dos genótipos por Eletroforese em Gel de Agarose

Os produtos da primeira e da segunda PCR foram revelados por meio da eletroforese em gel de Agarose (Invitrogen do Brasil). Os géis eram preparados na concentração 1,5% em tampão TBE 0,5 X e, depois de preparados eram acrescentados à solução 3 μ L de brometo de etídio. Em seguida, adicionava-se 3 μ L do padrão de peso molecular (100pb DNA Ladder – Invitrogen do Brasil) no primeiro canal, nos canais subsequentes eram colocados 5 μ L de amostra e 3 μ L de tampão de corrida (azul de bromofenol a 0,1%, EDTA 0,1 mM e glicerol a 50%) e no último canal era colocado 5 μ L de controle negativo (CN) e 2 μ L de tampão de corrida.

Após a inserção das amostras e reagentes era iniciada a corrida a 90 V por 60 minutos em temperatura ambiente. Após a eletroforese, os géis foram analisados por transiluminação com luz ultravioleta e fotografados com câmera digital.

3.5. Análise dos resultados

A análise dos resultados foi realizada por meio de análise descritiva (médias, porcentagens) e testes estatísticos (Teste Mann-Whitney “U” e Qui-Quadrado “ χ^2 ”) para verificação dos dados obtidos nas amostras de fezes diarréicas de crianças de 0 a 12 meses, de acordo com idade e sexo.

Algumas análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas Systat versão 9.0 e Epi Info versão 3.3.2/2005 (Centers for Disease Control and Prevention – CDC/USA e World Health Organization – Geneva). O Epi Info 3.2.2 TM foi utilizado para a construção do questionário e construção do banco de dados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Positividade para rotavírus humano

Durante o período de estudo foram analisadas por EGPA (Eletroforese em gel de Poliacrilamida) 294 amostras de fezes diarréicas, sendo que destas 28 (9,5%) apresentaram positividade para rotavírus (Figura 5).

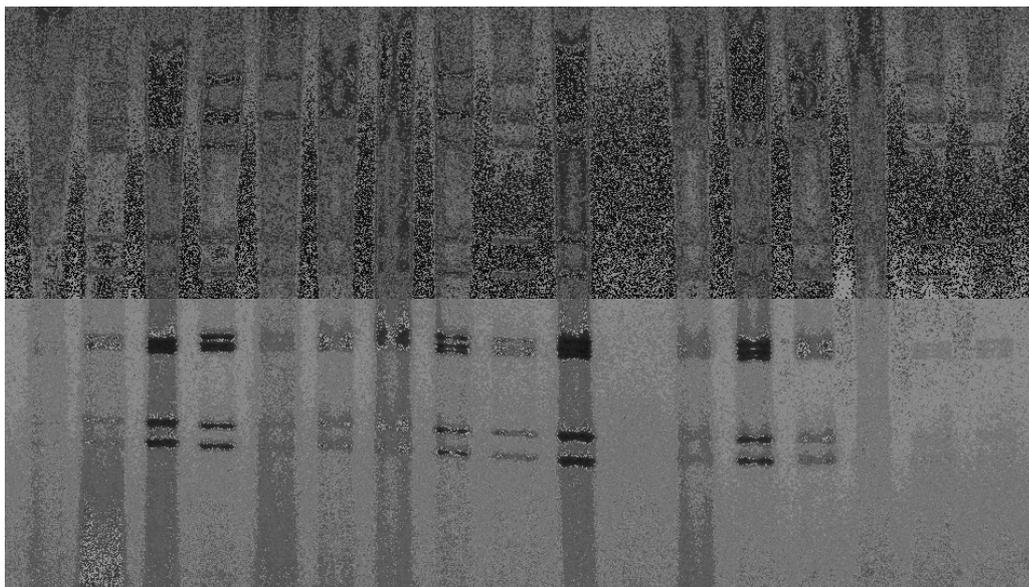


Figura 5 – Amostras positivas para rotavírus em fezes diarréicas de crianças de 0 a 12 meses vacinadas e não vacinadas contra rotavírus detectadas na Eletroforese em gel de Poliacrilamida em Manaus-AM.

A distribuição percentual das amostras positivas para rotavírus encontradas neste estudo está demonstrada no gráfico 1.

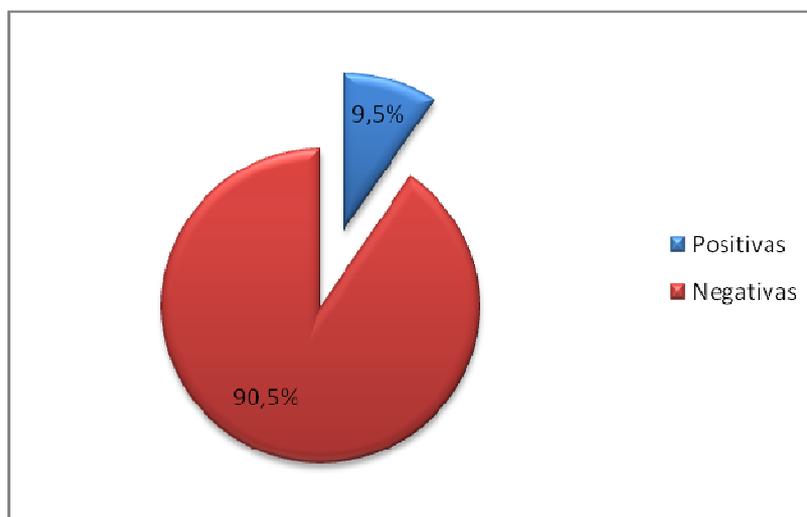


Gráfico 1 – Positividade para rotavírus humanos em amostras de fezes diarréicas coletadas de crianças de 0 a 12 meses na cidade de Manaus-AM, de maio de 2007 a maio de 2008.

Uma análise recente do CDC, em 2008, reunindo dados de 2001 a 2008, indicou um índice de mortalidade de aproximadamente 40% por diarreia relacionada a hospitalizações de crianças com menos de cinco anos de idade atribuídas à infecção por RV-A.

O presente estudo, realizado após a introdução da vacina no Programa Nacional de Imunização no Brasil, indicou uma incidência de 9,5% para RV-A, onde 39,8% das crianças incluídas no estudo foram vacinadas contra o agente, considerando-se somente as crianças que haviam tomado as duas doses da vacina.

Das 28 amostras (9,5%) positivas para rotavírus, 10 (36%) eram de crianças vacinadas, obtendo-se a prevalência de 8,54% (107 examinados/10 positivos). Em relação às amostras de

crianças não vacinadas, a prevalência foi de 10,2% (159 examinados/18 positivos) (Gráfico 2, Tabela 3). Santos (2008), em estudo de prevalência de rotavírus em crianças de 0 a 36 meses nos anos de 2003 a 2006, detectou uma prevalência de 25% para rotavírus A, nesse período a vacina ainda não havia sido introduzida no serviço público.

Em período anterior à introdução da vacina no calendário de vacinação do Brasil, Andreasi e colaboradores (2007), no Mato Grosso do Sul, observaram um índice de positividade de 23,2% para *Rotavirus A* em pesquisa no período de 2000 a 2004 e, em estudos realizados anteriormente na região Centro-Oeste do Brasil, os índices de detecção variaram de 11,8% a 37,2% em Goiânia (CARDOSO et al., 2003), sendo observado índice de 26% em Brasília (BRAGA, 2006).

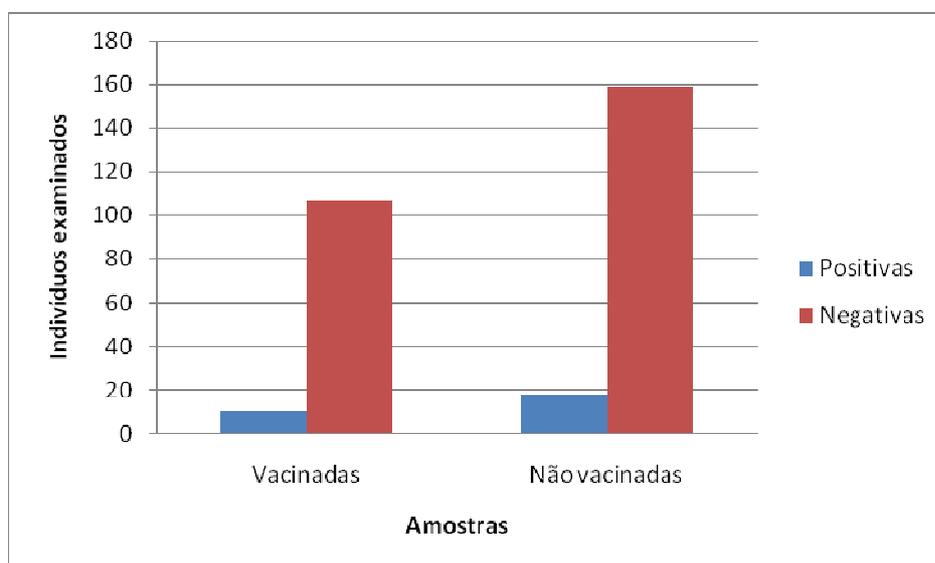


Gráfico 2 – Distribuição das amostras positivas para rotavírus humano em fezes diarréicas de crianças vacinadas e não vacinadas contra rotavírus na cidade de Manaus-AM.

Tabela 3

Prevalências para amostras de fezes diarréicas de crianças de 0 a 12 meses vacinadas e não vacinadas na cidade de Manaus, AM.

| Amostras | Número de amostras/ Prevalências (%) | | Total |
|--------------|--------------------------------------|---------------|-----------------|
| | Vacinadas | Não vacinadas | |
| Positivas | 10/8,5 | 18/10,2 | 28/9,5 |
| Negativas | 107/91,5 | 159/89,8 | 266/90,5 |
| Total | 117 | 177 | 294 |

As prevalências em relação ao sexo foram maiores no sexo feminino com 12,8% (12/125) em relação ao masculino com 7,10% (16/169) sem significância estatística ($p > 0,05$ teste χ^2) (gráfico 3). Esses resultados são diferentes aos encontrados por Carneiro e colaboradores (2005), possivelmente porque esses autores consideraram somente as amostras positivas em um estudo de características clínicas e epidemiológicas de crianças internadas por rotavírus na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, onde encontraram 53% das amostras positivas para rotavírus em crianças do sexo masculino e 47% nas crianças do sexo feminino sem diferença estatística. No nosso trabalho, diferentemente, consideramos as prevalências em relação à população examinada.

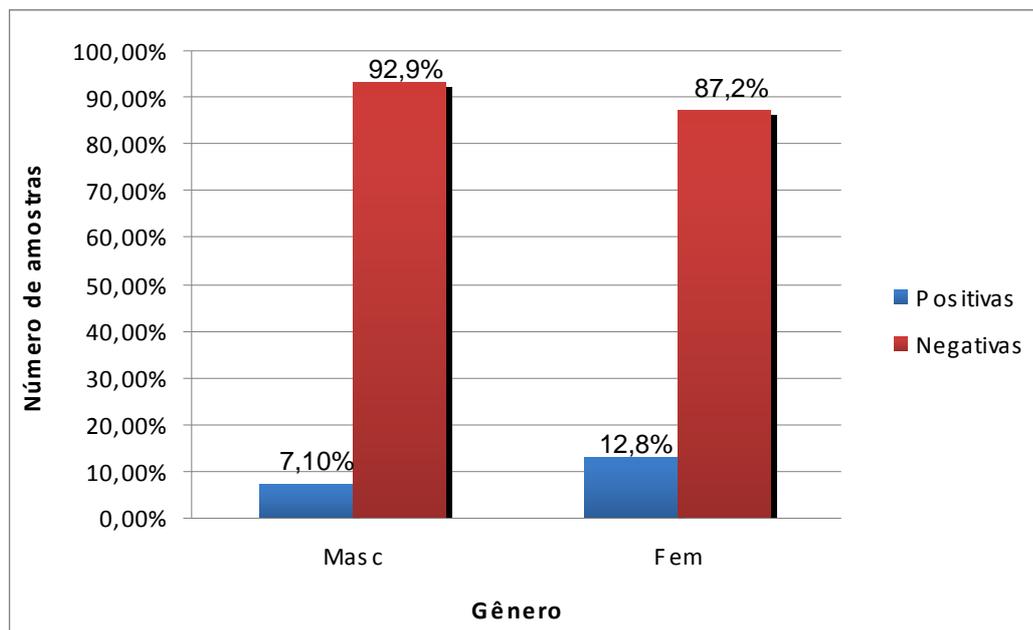


Gráfico 3 – Percentual de amostras positivas para rotavírus humano em crianças de 0 a 12 meses do sexo masculino e feminino em Manaus-AM.

Considerando a faixa etária, observou-se que as crianças entre 0 e 6 meses apresentaram maiores prevalências 10,0% (120 examinados/12 positivos) em relação as crianças de 7 a 12 meses com 9,30% (172 examinados/16 positivos). Levando em consideração apenas as amostras positivas (28), a faixa etária onde houve predominância de positividade para rotavírus foi de 7 a 12 meses com 16 amostras positivas, correspondendo a 57% do total de amostras positivas, seguido da faixa etária de 0 a 6 meses com 12 amostras (43%) (gráfico 4). Resultados semelhantes foram encontrados por Santos (2008), na cidade de Manaus, considerando somente as amostras positivas que observou maiores prevalências em crianças de 7 a 12 meses.

Andreas e colaboradores (2007), em estudo de detecção de rotavírus em crianças de até 3 anos no Mato Grosso do Sul, observou que a infecção por *Rotavirus A* ocorreu em todas as faixas

etárias, incluindo crianças com menos de seis meses de idade, embora também tenha tido ocorrência maior nas crianças situadas na faixa etária de 7 a 12 meses.

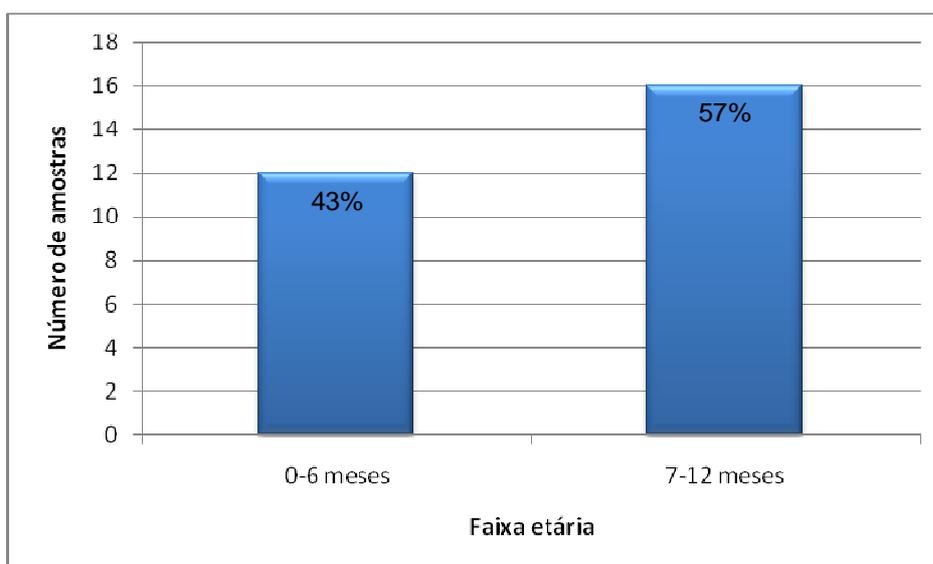


Gráfico 4 – Positividade com relação à faixa etária das amostras de fezes diarréicas de crianças de 0 a 12 meses vacinadas e não vacinadas contra rotavírus em Manaus, Amazonas.

Nos 13 meses de coleta, observou-se positividade para rotavírus em 11 meses, com as maiores prevalências nos meses de maio/07 (33,33%) junho/07 (16,7%), janeiro/08 (16,7%) e maio/08 (13,6%). Somente em agosto/07 e março/08 não foram encontradas amostras positivas (Gráfico 5). Considerando a distribuição de prevalências entre as crianças vacinadas e não vacinadas nos 13 meses de coleta, foi observado que as amostras positivas não demonstraram diferença estatística ($U = 69$ e $p = 0,42$, por teste Mann Whitney) (Tabela 4).

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 (2003), estudando a clínica e a epidemiologia da doença diarréica por rotavírus em crianças de Manaus, verificou uma elevação nos meses de maio, setembro, novembro e dezembro de 2002 e fevereiro de 2003, não demonstrando com isso se há um período onde ocorrem mais ou menos casos da doença.

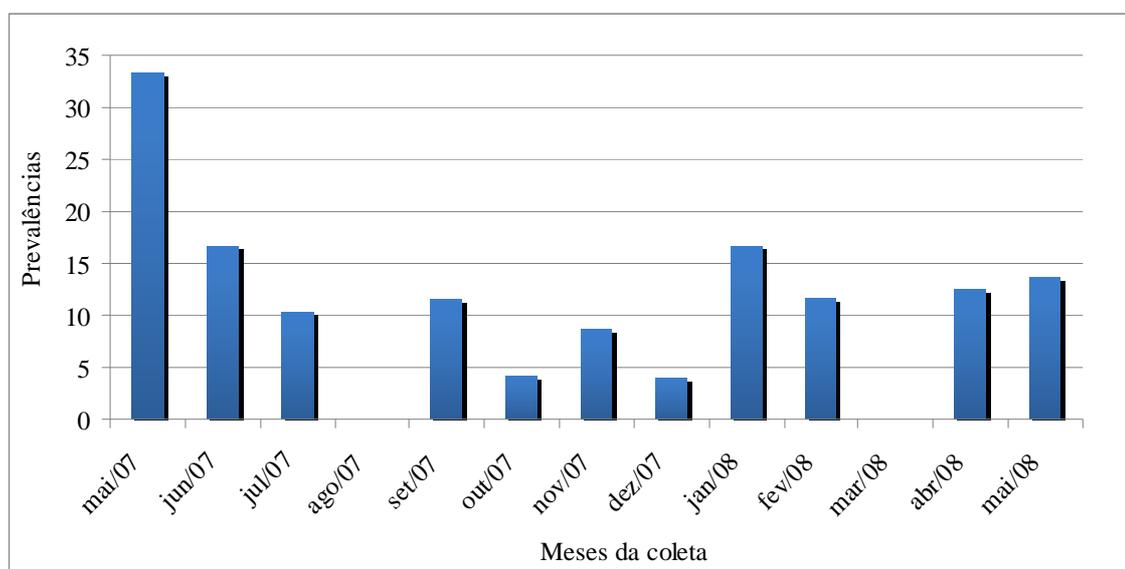


Gráfico 5 – Prevalências das amostras de fezes positivas para rotavírus humano distribuídas conforme o mês de ocorrência no período de maio de 2007 e maio de 2008 em Manaus, Amazonas.

Tabela 4

Distribuição mensal das prevalências entre as crianças vacinadas e não vacinadas no período de maio de 2007 e maio de 2008 em Manaus, Amazonas.

| Meses | Vacinados % | Não vacinados % |
|--------|-------------|-----------------|
| mai/07 | 0 | 40 |
| jun/07 | 0 | 25 |
| jul/07 | 7.14 | 13.3 |
| ago/07 | 0 | 0 |
| set/07 | 15.4 | 7.7 |
| out/07 | 14.3 | 0 |
| nov/07 | 0 | 18.2 |
| dez/07 | 8.3 | 0 |
| jan/08 | 0 | 23.5 |
| fev/08 | 14.3 | 10.5 |
| mar/08 | 0 | 0 |
| abr/08 | 22.2 | 6.7 |
| mai/08 | 14.3 | 12.5 |

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

Das 28 amostras positivas para rotavírus, 100% foram tipadas pelo método de RT-PCR para os genótipos P (VP4) e G (VP7), sendo que 18 amostras (64,3%) apresentaram características de genótipos G ou P ou ainda combinações dos genótipos P e G e 10 amostras (35,7%) não apresentaram características de nenhum dos genótipos pesquisados. A figura 6 mostra a foto de um gel com amostras positivas para o genótipo P (VP4) e a figura 7 a foto de um gel de agarose com amostras positivas para G (VP7).

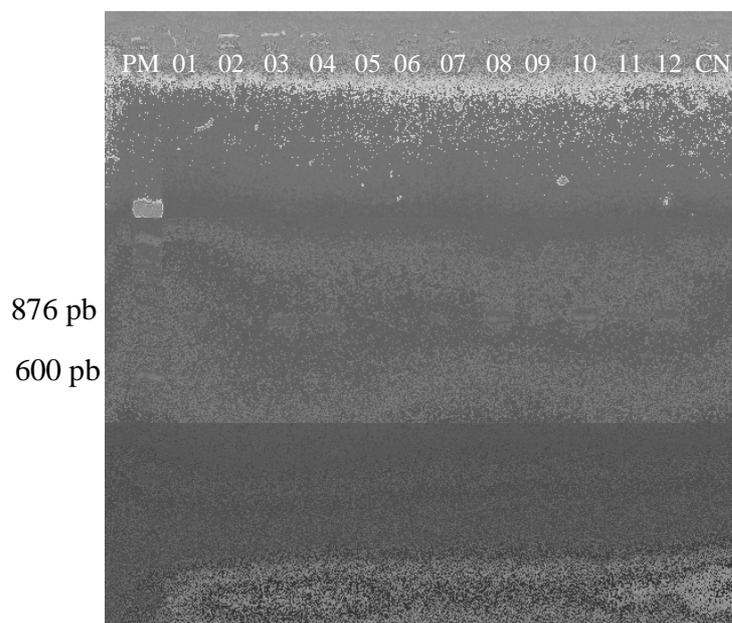


Figura 6 – Foto de gel de agarose com amostras positivas para rotavírus genótipo P (VP4).

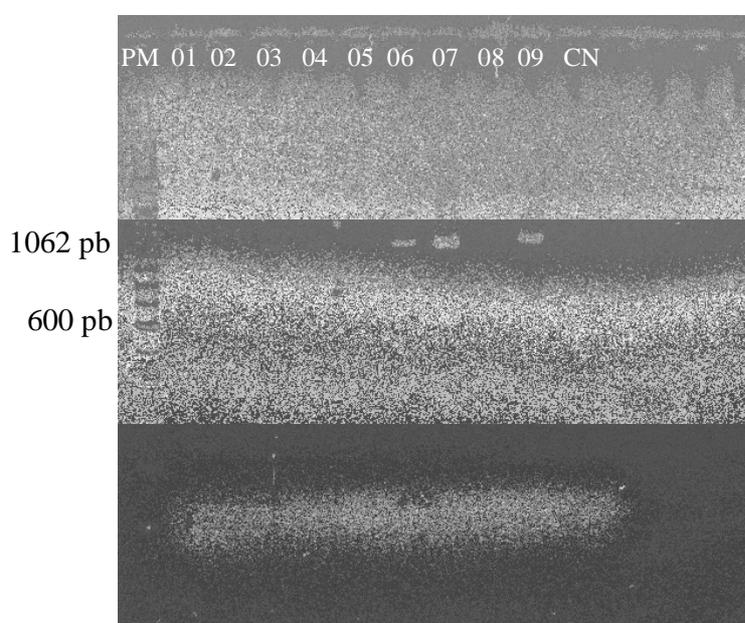


Figura 7 – Foto de gel de agarose com amostras positivas para rotavírus genótipo G (VP7).

Das amostras de crianças com as duas doses da vacina, 8 (80%) apresentaram características de genótipos G ou P e duas (20%) não apresentaram características de nenhum dos genótipos pesquisados.

Na análise das 18 amostras positivas para o genótipo P ou G, observou-se que a ocorrência de combinações dos dois genótipos ocorreu em nove amostras (50%), e oito amostras (44,4%) apresentaram características somente do genótipo P e uma amostra (5,6%) apresentou característica apenas do genótipo G, com isso somando-se as amostras com características de um único genótipo e as que apresentaram combinações dos dois genótipos P e G, pode-se concluir que, das 28 amostras positivas para rotavírus, 17 (60,7%) apresentaram características do genótipo P e 10 (35,7%) apresentaram características para o genótipo G.

Na análise das oito amostras de crianças que estavam com a vacinação completa contra rotavírus, a ocorrência da combinação dos dois genótipos ocorreu em cinco amostras (62,5%), e três amostras (37,5%) apresentaram características apenas do genótipo P.

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 (FERRERA et al., 2007 apud CARVALHO-COSTA, 2009; AMARILHA et al., 2007; RAHMAN et al., 2007). Entretanto, no que se refere à prevalência de rotavírus humano em crianças vacinadas e não vacinadas contra rotavírus, poucos são os estudos realizados sobre a avaliação dos efeitos causados após a introdução da vacina em alguns países do mundo.

Neste estudo utilizaram-se os iniciadores Con 2 e Con 3 para amplificação do gene 4 e os primers Beg9 e End9 para amplificar o gene 9, com esta metodologia, observou-se que 18 amostras (64,3%) apresentaram características para G ou P, porém, 10 (35,7%), apesar da

positividade para 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, entretanto, para que essa afirmativa seja considerada são necessários estudos mais detalhados, onde sejam empregados iniciadores que possam identificar genes incomuns de rotavírus. A análise das amostras negativas e positivas para os genótipos P e G pode ser observada na tabela 5, e o número de amostras positivas e de combinações para estes dois genótipos pode ser visualizada no gráfico 6.

Tabela 5

Amostras tipadas e não tipadas para os genótipos P e G em amostras de fezes diarréicas de crianças de 0 a 12 meses em Manaus, AM.

| Amostras Positivas e Negativas para Genótipos P e G | | | | |
|---|--------------|-----------|-----------|--------------|
| Genótipo G | | | | |
| | | Negativas | Positivas | Total |
| Genótipo P | Negativas | 8 | 2 | 10 |
| | Positivas | 8 | 10 | 18 |
| | Total | 16 | 12 | 28 |

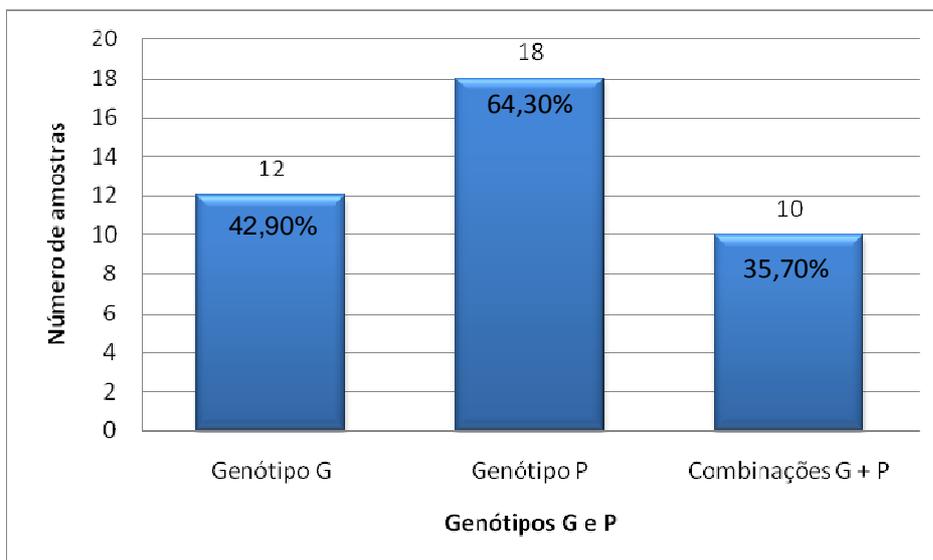


Gráfico 6 – Distribuição da positividade dos genótipos P e G e das combinações P e G em amostras de fezes positivas para rotavírus humano de crianças de 0 a 12 meses em Manaus, AM.

Das 12 amostras positivas para o genótipo G observou-se que duas (17%) não apresentaram características de nenhum dos subgrupos G pesquisados no estudo.

O fato destas amostras não terem apresentado característica de nenhum dos cinco genótipos pesquisados, levanta a suspeita de que, na região, pode estar ocorrendo a circulação dos 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 (ROSA E SILVA et al., 2001), principalmente, devido à introdução da vacina no calendário de vacinação do Ministério da Saúde.

Nas demais amostras positivas para o genótipo G, somente o genótipo G2 apareceu no estudo, com 10 amostras (83%). Em estudos anteriores, mesmo antes da introdução da vacina no PNI/MS em 2006, o genótipo G2 já apresentava maior prevalência que o G1, até então mais comum, onde apareceu com 17% de positividade e G1 com 14% (SANTOS, 2008).

Em vista dos dados apresentados em diversos estudos, o genótipo G2 não pode ser mais considerado incomum no Brasil e em outros países, pois Santos (2003) observou uma frequência de 22% deste genótipo em amostras de fezes diarréicas positivas para rotavírus no Rio de Janeiro, Brasil. Mascarenhas (2002), também, detectando os genótipos P e G de crianças de Belém no estado do Pará, encontrou 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).

Após a introdução da vacina contra rotavírus no Brasil, foi observada uma predominância expressiva de 74% de genótipo G com característica de G2 e associado com o genótipo P com característica de P[4] e G2P[NT]. Em 2006-2007, o genótipo G2 foi detectado nos estados do Rio de Janeiro, Sergipe, Pernambuco, Piauí e Minas Gerais (LEITE et al., 2008). Uma recente análise preliminar indica a re-emergência do genótipo G2 no norte do Brasil, chegando a um percentual acima de 90% de todos os rotavírus do grupo A isolados desde 2006 (OLIVEIRA et al., 2008, apud LEITE et al., 2008).

Quanto aos genótipos P, verificou-se que das 18 amostras positivas, o genótipo P[4] foi observado em 17 (94%) e não foram detectados outros tipos de genótipo P. Apenas 1 amostra positiva para o genótipo P não apresentou característica de nenhum dos genótipos pesquisados.

As combinações dos genótipos G e P foram responsáveis por nove (50%) das 18 amostras positivas para G ou P. Analisando-se as combinações constatou-se que apenas a combinação G2P[4] foi detectada no estudo estando presente nas nove amostras, sendo que cinco (55,5%) destas amostras eram de crianças que apresentavam as duas doses da vacina.

Nesse trabalho não foi encontrado o genótipo G1P[8], que caracteriza o genótipo da vacina Rotarix®, adotada no Brasil pelo Ministério da Saúde no Programa Nacional de Imunização em 2006, entretanto das 10 amostras positivas de crianças vacinadas, 5 eram de crianças infectadas com o genótipo G2P[4].

Carvalho-Costa e colaboradores (2009) analisando a distribuição genotípica após a introdução da vacina no Rio de Janeiro, Brasil, detectou em seu estudo um percentual de 96% para a combinação G2P[4] no Rio de Janeiro, Brasil. Carvalho-Costa e colaboradores (2009), no mesmo estudo, não detectou a combinação G2P[4] de 2000 a 2004 no Rio de Janeiro, mas foi detectada em 2005 com um percentual de 1,4% e ainda uma re-emergência de 41% em 2006.

Ainda neste estudo, considerando somente as crianças elegíveis para vacinação completa, 29% (4/14) foram positivas para rotavírus do grupo A e 58% (35/60) foram negativas (odds ratio 0,29, 95% de intervalo de confiança 0.07-1,15; $p = 0.043$ por teste exato de Fisher). As quatro amostras positivas de crianças vacinadas estavam infectadas com o genótipo G2P[4] (CARVALHO-COSTA et al., 2009).

Estudos semelhantes foram realizados nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro e Sergipe sugerindo uma re-emergência desta combinação de genótipos em todo o Brasil. Vale ressaltar que nestes estudos, muitas amostras caracterizadas com a combinação G2P[4] foram coletadas logo após a introdução da vacina contra rotavírus, no primeiro semestre do ano de 2006, e ainda, muitas crianças incluídas nestes estudos, não haviam

sido vacinadas por não possuírem idade suficiente (LEITE et al., 2008). Portanto, sugere-se que a re-emergência de G2P[4] provavelmente não está associada à vacinação.

Entretanto, em estudos recentes no nordeste do Brasil, após a introdução da vacina Rotarix®, todas as cadeias identificadas em 2007 pertenciam ao genótipo G2P[4] (GURGEL et al., 2007; NAKAGOMI et al., 2008), os autores afirmam que, baseando-se no resultado encontrado, pode haver a possibilidade da emergência de cadeias de genótipos não incluídos na vacina, porém, o fato pode ter ocorrido apenas por oportunidade e mais estudos são necessários para confirmar ou refutar esta hipótese (GURGEL et al., 2008).

Em outros trabalhos é observado que a emergência da combinação G2P[4] nos últimos anos parece refletir um fenômeno continental. Neste contexto, uma epidemia de diarreia por rotavírus A, com uma alta incidência de G2P[4] foi reportada em Honduras (FERRERA et al., 2007). Trabalhos realizados em El Salvador, Guatemala e Honduras demonstraram que a combinação de genótipos G2P[4] foi a que apresentou maior prevalência no ano de 2006 (PATEL et al., 2008). No Paraguai, rotavírus com características de G2P[4] foi detectado em 2005 após seis anos de ausência (AMARILHA et al., 2007).

Países da América Latina que apresentam limites com o Brasil e ainda não introduziram a vacinação contra rotavírus no setor público, detectaram o crescimento da combinação G2P[4] antes da implementação da vacina Rotarix® no Brasil.

Interessantemente, fora da América Latina, as taxas de rotavírus com características de G2P[4] tiveram um recente crescimento em Bangladesh (43% em 2005-2006) (RAHMAN et al., 2007).

Este estudo está entre os primeiros realizados na região norte sobre a avaliação dos efeitos da Rotarix® no Brasil, primeiro país da América Latina a introduzir uma vacina universal contra

Rotavirus. Entretanto, os achados indicam a emergência de um tipo até então incomum na região sugerindo contínua monitorização do Ministério da saúde com vistas no controle epidemiológico das rotaviroses.

5. CONCLUSÃO

- 5.1. A ocorrência de rotavírus em amostras de fezes diarréicas de crianças de 0 a 12 meses atendidas nos prontos socorros infantis do município de Manaus, AM de maio de 2007 a maio de 2008 foi de 9,5%.
- 5.2. A ocorrência de rotavírus em amostras de fezes diarréicas de crianças vacinadas atendidas nos prontos socorros infantis do município de Manaus, AM de maio de 2007 a maio de 2008 foi de 36% considerando as amostras positivas.
- 5.3. Pela genotipagem das amostras positivas para rotavírus humano por meio do método de RT-PCR, ficou constatado que 64,3% destas amostras pertenciam aos genótipos P ou G pesquisados neste estudo e que outras 35,7% não apresentavam características de nenhum dos dois genótipos pesquisados.
- 5.4. De todos os genótipos G pesquisados somente foi detectado o genótipo G2, sendo encontrado em 42,9% das amostras positivas para rotavírus humano.
- 5.5. Dezessete por cento das amostras tipadas para o genótipo G não apresentaram características de nenhum dos subgrupos G pesquisados, indicando a possibilidade de circulação de subgrupos incomuns na região.

- 5.6. De todos os genótipos P pesquisados, somente o genótipo P[4] foi detectado, estando presente em 94% das amostras positivas para rotavírus humano. Apenas uma amostra positiva para o genótipo P não apresentou característica de nenhum dos genótipos P pesquisados.
- 5.7. A combinação dos genótipos P e G, G2P[4], foi responsável por 50% das 18 amostras positivas para P ou G, sendo a única combinação detectada nas amostras positivas para rotavírus humano.
- 5.8. Considerando somente as crianças elegíveis para a vacinação completa, a positividade para rotavírus foi de 35,7% (10/28) e a negatividade de 40,2% (107/266). Das 10 amostras positivas, considerando apenas as crianças vacinadas, 5 eram de crianças infectadas com o genótipo G2P[4].
- 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. Os casos de rotavírus humano, bem como das amostras positivas para os genótipos G e P ocorreram de forma similar durante o ano todo.
- 5.11. Em vista dos resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que a vacina utilizada no Programa Nacional de Imunização do Ministério da Saúde contra rotavírus humano seja incorporada proteção contra os genótipos virais G2 e P[4].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, Kamruddin; ANH, Dang Duc; NAKAGOMI, Osamu. Rotavirus G5P[6] in Child with Diarrhea, Vietnam. *Emerg Infect Dis*, v. 13, n. 8, p.1232-1235, 2006.
- AMARILLA, A.; ESPÍNOLA, E. E.; GALEANO, M. E.; FARIÑA, N.; RUSSOMANDO, G.; PARRA, G. I. Rotavirus infection in the Paraguayan population, from 2004 to 2005: high incidence of rotavirus strains with short electropherotype in children and adults. *Med Sci Monit*, v.13, p.333–337, 2007.
- ANDREASI, Márcia Sueli Assis; BATISTA, Sonia Maria Fernandes; TOZETI, Inês Aparecida; OZAKI, Cláudia Okanobo; NOGUEIRA, Mariana Menegusso; FIACCADORI, Fabíola Souza; BORGES, Ana Maria Tavares; SANTOS, Rodrigo Alessandro Togo; CARDOSO, Divina das Dores de Paula. 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.
- ANGEL, Joana; FRANCO, Manoel A.; GREENBERG, Harry B. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nature reviews*, v. 5, p.529-39, 2007.
- BALDACCI, Evandro R.; CANDEIAS, J. A. N; BREVIGLIERI, José Carlos; GRISI, Sandra Josefina A. Etiologia viral e bacteriana de sacos de gastroenterite infantil: Uma característica clínica. *Revista de Saúde Pública*, v.13, n. 1, 1979.
- BANYAI, Krisztián; GENTSCH, Jon R.; SCHIPP, Renata; JAKAB, Ferenc; BENE, Judit; MELEGH, Bela; GLASS, Roger I.; SZÜCS, György. Molecular epidemiology of human P[8], G[9] rotaviruses in Hungary between 1998 and 2001. *Journal of Medical Microbiology*, v.53, p.791-801, 2004.
- BRAGA, K. N. L. Caracterização de genótipos G de rotavírus do grupo A circulantes no Distrito Federal. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Doença Diarréica por Rotavírus: vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humanos (VORH) Versão Preliminar*, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Doença Diarréica por Rotavírus: vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humanos (VORH)*, 2006.
- BRESEE, J.; GLASS, R. I.; IVANOFF, B.; GENTSCH, J. Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation, and implementation in developing countries. *Vaccine*, v.17, p.2207–22, 1999.
- BREVIGLIERI, José Carlos. Rotavírus humanos. Morfologia e patogenia. *Revista pediatria (São Paulo)*, v.1, p.314-318, 1979.

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

CARDOSO, D. D. P.; SOARES, C. M. A.; SOUZA, M. B. L. D.; AZEVEDO, M. S. P.; MARTINS, R. M. B.; QUEIROZ, D. A. O.; BRITO, W. M. E. D.; MUNFORD, V.; RÁCZ, M. L. Epidemiological features of rotavirus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.98, p.25-29, 2003.

CARMO, Eduardo Hage. Doença diarreica por rotavirus: magnitude, introdução da vacina e desafios para a vigilância epidemiológica. *Caderno Saúde Pública*, v. 22, n.11, p.2266, 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, I; SILVA, L.R. Clical na 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, Filipe Aníbal; ARAÚJO, Irene Trigueiros; ASSIS, Rosane Maria Santos de; FIALHO, Alexandre Madi; MARTINS, Carolina Maria Miranda de Assis; BÓIA, Márcio Neves; LEITE, José Paulo Gagliardi. Rotavirus Genotype Distribution after Vaccine Introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.15, n.1, 2009.

COIRO, José Rafael Rosito; ALMEIDA NETO, Alcides Jorge de; HEUSER, Maria Cristina Fassioni; BENDATI, Maria Mercedes; VASCONCELLOS, Vera Lucis; STARHAN, Mirela; RODRIGUES, Jaqueline Josi Sama. Pesquisa exploratória 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.531-36, 1983.

COLUCHI, Norma; MUNFORD, Veridiana; MANZUR, Julio; VAZQUEZ, Cynthia; ESCOBAR, Mabel; WEBER, Ernesto; MÁRMOL, Perla; RÁCZ, Maria Lucia. Detection, subgroup specificity and genotype diversity of Rotavirus strains in children with acut diarrhea in Paraguay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.5, 1709-1714, 2002.

COSTA, C; TIMESNESTSKY, M.C.S.T.; CARMONA, R.C.C. Human Rotavírus 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**, 1997, p.307.

COSTA, Cristóvão Alves. Epidemiologia de rotavírus na Cidade de Manaus/Am. *Relatório Final* – Projeto PPI-2005 – Diagnóstico Microbiológico de Doenças Incidentes da Amazônia, 2006.

COSTA, Cristóvão Alves; CANDEIAS, José Alberto Neves; CAPELETTI, Edna Lílian Lira. Eletroferótipos de rotavírus em crianças com e sem quadros de gastroenterite. *Revista de Saúde Pública*, v.24, n.2, 1990a.

DAVIDSON, G. P.; GALL, D. G.; PETRIC, M.; BUTLER, D. G.; HAMILTON, J. R. Human rotavirus enteritis induced in conventional piglets. Intestinal structure and transport. *J Clin Invest*, v.60, n.6, p.1402-1409, 1977.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication,. In B. N. Fields, D. Knipe, et al. (ed.), *Virology*, 3a. ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. p.1625–1655, 1996.

FERNANDES, José V.; FONSECA, Sylvia M. D.; AZEVEDO, Jenner C. V.; MARANHÃO, Hécio de S., FONSECA, Maria H. M.; DANTAS, Marianna T.; MEISSNER, Rosely de V. Rotavirus detection in feces of children with acute diarrhea. *Jornal de Pediatria*, v.76, n. 4, p.300-04, 2000.

FERNÁNDEZ, Maria de Los Angeles Gonzáles; RODRIGUES, Roxana Hidalgo; BLAY, Lis Silva. Rotavírus: Enferdad emergente de transmisión digestiva. *Revista Cubana de Pediatria*. v.75, n.1, 2003.

FERREIRA, Fabiana Fioretti Martins. *Detecção e caracterização molecular de Rotavirus grupo A em Igarapés da cidade de Manaus, Amazônia Central / Detection and molecular characterization of rotavirus group A in Igarapés of the city of Manaus, Central Amazônia*. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2007. Dissertação (Mestrado). Instituto Oswaldo Cruz, 75p, 2007.

GIGLIO, Elias Alfredo; BALDACCI, Evandro Roberti; OKAY, Yassunhiko. Introdução ao estudo do rotavírus. *Revista Pediatria (São Paulo)*, v.14, n.2, p. 49-54, 1992.

GLASS, Roger I. Combate ao rotavírus. *Scientific American Brasil*. P. 42-8, 2006.

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. S. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, p.1333-1337, 1994b.

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.

GRIMWOOD, K.; KIRKWOOD, C.D. Human rotavirus vaccines: too early for the strain to tell. *Lancet*, v. 371, p. 1144-1145, 2008.

GURGEL, R. Q.; CORREA, J. B.; CUEVAS, L. E. Effect of rotavirus vaccination on circulation virus strains. *Lancet*, v. 371, p.301-302, 2008.

GURGEL, Ricardo Q.; CUEVAS, Luis E.; VIEIRA, Sarah C. F.; NAKAGOMI, Osamu; NAKAGOMI, Toyoko; DOVE, Winifred; CUNLIFFE, Nigel; HART, Charles A. Predominance of Rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.13, n.10, 2007.

JAYASHREE, S.; BHAN M. K.; KUMAR R.; BHANDARI N.; SAZAWAL S. Protection against neonatal rotavirus infection by breast milk antibodies and trypsin inhibitors. *Journal of Medical Virology*, v. 26, n. 3, p.333-338, 1988.

KALE, Pauline Lorena; FERNANDES, Cristiano; NOBRE, Flávio Fonseca. Padrão temporal das internações e óbitos por diarreia em crianças, 1995 a 1998, Rio de Janeiro. *Revista de Saúde Pública*, v.38, n.1, 2008.

KAPIKIAN, A. Z., AND R. M. CHANOCK. Rotaviruses. In Fields, B. N., Knipe, D. M.; Chanock, R. M.; Hirsch, M. S.; Melnick J. L.; Monath, T. P.; Roizman, B. (ed.). *Virology*. 2. ed., v. 2. New York: Raven Press, p.1353–1404, 1990.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p. 680-5, 1970.

LEITE, José Paulo Gagliardi; CARVALHO-COSTA, Filipe Aníbal; LINHARES, Alexandre C. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience – A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n.8, p.745-753, 2008.

LIMA, J C. *Caracterização evolutiva da proteína não-estrutural 4 de rotavírus do grupo A*. São Paulo: UNIFESP, 2007. Dissertação (Mestrado em Informática em Saúde) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2007.

LINHARES, Alexandre C. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. *Caderno e Saúde Pública*, v. 16, n. 3, 2000.

LINHARES, Alexandre C.; GABBAY, Yvone B.; MASCARENHAS, Joana D’Arc P.; FREITAS, Ronaldo B. de; OLIVEIRA, Consuelo S.; BELLESI, Newton; MONTEIRO, Talita F.; LINS-LAINSON, Zéa; RAMOS, Francisco L. P.; VALENTE, Sebastião 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, Alexandre C.; OLIVEIRA Consuelo S.; GABBAY Yvone B.; MASCARENHAS, Joana D’Arc P.; FREITAS, Ronaldo B. Gastroenterites por rotavírus. In: **Doenças Infeciosas e Parasitárias- Enforque Amazônico**. Belém: CEJUP, 1997.

LOURENÇO, M. H.; NICOLAS, J. C.; COHEN, J. Study of human rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. *Ann. Virol.*, (Paris), v.1232, p.161-73, 1981.

LUZ, Cláudia Regina N. E. da; MASCARENHAS, Joana D’Arc P.; GABBAY, Yvone B.; MOTTA, Ana Regina B.; LIMA Telma Vitorina Ribeiro; SOARES, Luana da S.; LINHARES, Alexandre C. Rotavirus serotypes and electropherotypes identified among hospitalized 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; RACZ, M. G and P rotavirus genotypes in stool samples from children in Terezina, state of Piauí. *Revevista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 40, p.381-384, 2007.

MASCARENHAS, J. D.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; LEITE, J. D. P. Detection and characterization of rotavírus G and P types in children participating in a rotavirus vaccine trial in Belém, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.97, p.113-117, 2002.

MOYO, Sabrina J.; GRO, Njolstad; KIRSTI, Vainio; MATEE, Mecky I.; KITUNDU, Jesse; MASELLE, Samwel Y., LANGELAND, Nina; MYRMEL, Helge. 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, n.359, p.1-6.

MUNFORD, Veridiana; SOUZA, Eloisa Correia; CARUZO, Thabata Alessandra Ramos; MARTINEZ, Mariana Baquerizo; RÁCZ, Maria Lúcia. 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. U.; 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. *Archives of Virology*, v.153, n.5, p.957-960.

O'MAHONY, Jim; FOLEY, Bárbara; MORGAN, Sheila; MORGAN, John G.; HILL, Colin. 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.

PATEL, M. M.; OLIVEIRA, L. H.; BISPO, A. M.; GENTSCH, J.; PARASHAR, U. D.; Rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg Infect Dis*, v.14, p.863-885, 2008.

PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J.P.G.; CANDEIAS, J. A. N.; RÁCZ, M.L.; Linhares, AC.; Gabbay, Y.B.; Trabulsi, J.R. Eletrophoretic study os the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brasil. *J. J.Hyg.*, v. 90, p.117-126, 1998.

PEREIRA, H. G.; LINHARES, A. C.; CANDEIAS, J. A. N.; GLASS, R. J. Vigilância de los vírus de la gastroenteritis en los laboratoios nacionales del Brasil. *Bol. of Sanit. Panam.*, v.116, p.27-36, 1994.

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.; BREESE, J. S.; GLASS, R. I. Detection an Characterization of Novel Rotavirus Strains in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n.11, p.3223-3229, 1998.

RAHMAN, Sasirekha; KANG, Gagandeep. Burden of disease & molecular epidemiology of group A rotavirus infections in India. *Indian Journal of Medical Research*, v.125, p.619-932, 2007.

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

ROCHA, Lúcia Alves da. *Aspectos Epidemiológicos e Clínicos 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 Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2003.

ROSA E SILVA, Maria Luzia da; NAVECA, Felipe Gomes; CARVALHO, Iná Pires de. Epidemiological aspects of rotavirus infections in Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.5, n.4, 2001.

SANTOS, Giane Zupellari. *A Ocorrência de genótipos com características de rotavírus humano em amostras de fezes diarréicas de crianças atendidas em prontas socorros infantis do município de Manaus-Am*. Manaus: UFAM/INPA, 2008. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical), Universidade Federal do Amazonas/Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia, 2008.

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

SANTOS, Norma; SOARESA, Caroline C.; VOLOTÃO, Eduardo M.; ALBUQUERQUE, Maria Carolina M.; HOSHINO, Yasutaka. 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.

SILVEIRA, Waldemir de Castro. **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, Gregory; HENRY, Nancy. Rotavírus. In WILSON, Walter R; SANDE. Merle A. **Doenças Infecciosas: Diagnóstico e Tratamento**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

UCHIDA, Ryuichi; PANDEY, Basu Dev.; SHERCHAND, Jeevan Bahadur; AHMED, Kamurddin; YOKOO, Michiyo; NAKAGOMI, Toyoko; CUEVAS, Luis E.; CUNLIFE, Nigel A.; HART, C. A.; NAKAGOMI, Osamu. 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.

USA. Center for Diseases Control and Prevencion/Press Release. CDC's Advisory Committee Recomend New Vaccine to Prevent Rotavirus. 2006. Disponível em: <http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/r06221.htm>, acesso em 18 de agosto de 2006.

USA. Center for Diseases Control and Prevencion/Respiratory and Enteric Viruses
Blanch. Viral gastroenteritis. 2006. Disponível em:
<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/gastro/faq-sp.htm>, acesso em 18 de agosto de 2006.

VERGARA, Rodrigo F.; NAVARRETE, Maria S.; NÚÑEZ, Ernesto; ESCOBAR, Lorena;
NAVARRO, Sofia G.; VENEGAS, Guillermo E.; SHUFFENEGGER, Patrícia; O'RYAN,
Miguel. Impacto de gastroenterite severa para rotavírus em crianças chilenas menores de 3
anos de idade. *Revista médica do Chile*, v.135, p.975-981, 2007.

VRANJAC, Alexandre. Diarréia e Rotavírus. *Revista Saúde Pública*, v. 38, n.6, 2004.