

RITA DE CÁSSIA COMPAGNOLI CARMONA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DOS ROTAVÍRUS HUMANOS DETECTADOS EM
PACIENTES COM DIARRÉIA AGUDA NO ESTADO DE SÃO PAULO, NO PERÍODO
DE 1996 A 2006**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Doutor em Ciências.

SÃO PAULO
2010

RITA DE CÁSSIA COMPAGNOLI CARMONA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DOS ROTAVÍRUS HUMANOS DETECTADOS EM
PACIENTES COM DIARRÉIA AGUDA NO ESTADO DE SÃO PAULO, NO PERÍODO
DE 1996 A 2006**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia
Orientador: Prof. Dr. Leonardo J. Richtzenhain

SÃO PAULO
2010

*Que Deus, Arquiteto do Universo, nos de a capacidade para avaliar nosso sucesso,
por aquilo a que renunciamos para obtê-lo.*

Aos meus pais,
Rita Compagnoli, com amor e respeito e
Cláudio Compagnoli (*in memoriam*), saudade sempre.

Ao meu marido,

Marcos,
amigo e companheiro, pelo amor, carinho, incentivo
e apoio em todos os momentos de minha
vida pessoal e profissional

Aos meus filhos,

Ivan e Alan, razões de minha vida.

Agradeço por me permitirem conhecer o sentimento mais
sublime de todos: **amor materno**.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, orientador, pelas sugestões, incentivo e confiança plena depositada em meu trabalho. Meu respeito e admiração como profissional e ser humano.

A amiga Maria do Carmo S. T. Timenetsky, pela longa amizade, pelo aprendizado durante minha formação científica e incentivo desse trabalho.

Ao Dr. Yasutaka Hoshino pela orientação e apoio na realização de parte desse trabalho.

Ao Dr. Albert Kapikian, pela oportunidade de desenvolver parte do trabalho.

Ao amigo Mauricio Realpe, pela colaboração nas reações de sequenciamento e análise filogenética.

Ao André Serradas, da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela revisão bibliográfica e profissionalismo.

Aos colegas do Núcleo de Doenças Entéricas, Adriana, Antonio, Audrey, Bethânia, Bráulio, Cibele, Cleusa, Creuza, Denise, Samira, Simone e Sirlene.

Aos colegas do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, pela amizade e respeito.

A todos aqueles, que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste trabalho.

O presente trabalho foi desenvolvido no Núcleo de Doenças Entéricas, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz.

RESUMO

CARMONA, R. C. C. **Diversidade genética dos rotavírus humanos detectados em pacientes com diarreia aguda no Estado de São Paulo, no período de 1996 a 2006.** 2010. 181 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O rotavírus é considerado o principal agente etiológico das gastroenterites graves em crianças em todo o mundo. Em março de 2006, uma vacina contra rotavírus (oral, atenuada, monovalente, P[8]G1, Rotarix® GlaxoSmithKline Biologicals) foi introduzida no Brasil no calendário de rotina de imunização infantil. O estudo da diversidade genética dos rotavírus, antes e após a introdução desta vacina pode ser importante para o desenvolvimento de estratégias de vacinação. Um total de 8.961 amostras fecais coletadas de pacientes com diarreia aguda, durante o período de vigilância de 11 anos no Estado de São Paulo (1996-2006) foi testado para rotavírus por ELISA. Destas, 1.784 (20,0%) foram positivas, e posteriormente a caracterização dos rotavírus em genótipos G e P foi realizada em 1.300 amostras por nested RT-PCR. O genótipo G1 de rotavírus foi o mais freqüente, detectado em 35,2% das amostras, seguido do tipo G9 (31,2%), G2 (4,0%), G3 (3,5%), G4 (2,2%), infecção mista (1,8%) e G12 (0,5%). A associação mais freqüente foi a P [8]G1 e P [8] G9. Foi realizada a sequência nucleotídica do gene 9 (VP7) de 38 rotavirus genótipo G1, selecionados de um total de 341 P[8]G1. Duas cepas foram analisadas de cada ano como 1997, 1998, 2001 e 2002, três cepas do ano 1996, 1999 e 2003, quatro cepas em 2000, sete cepas foram em 2004 e 2005, e cinco em 2006. Os 38 rotavírus G1 neste estudo foram classificados em duas linhagens distintas, linhagem G1-I, com 44,7% (17/38) e linhagem G1-II com 55,3% (21/38). A linhagem G1-I foi detectada durante seis anos, 1996-1997, 2001-2002 e 2004-2006, e a linhagem G1-II foi detectada durante os anos de 1998-2001, e 2003-2005. Análises preliminares mostraram que Rotarix® foi eficiente contra estas linhagens G1.

Palavra-chave: Rotavírus. Diarreia. Genótipos. Diversidade genética. Análise Filogenética. Linhagens. Vacina.

ABSTRACT

CARMONA, R. C. C. **Genetic diversity of Human Rotaviruses detected in patients with acute diarrhea in São Paulo, from 1996 to 2006.** 2010. 181 p. Ph D Thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Rotavirus (RV) infections are recognized as a major cause of severe gastroenteritis in children worldwide. In March 2006, a monovalente P[8]G1, human RV vaccine (Rotarix[®] GlaxoSmithKline Biologicals) was introduced in Brazil into the routine childhood immunization schedule. Therefore, the study of genetic diversity among rotavirus strains before and after the introduction of this vaccine may be important for the development of vaccination strategies. A total of 8,961 fecal samples collected from patients with acute diarrhea, during the 11-year period surveillance in São Paulo State (1996 to 2006) were tested for rotavirus by ELISA. One thousand seven hundred eighty-four (1,784, 20.0%) were positive, and the characterization of the G and P genotypes was performed on 1,300 rotavirus samples by nested RT-PCR. The G1 type was the most prevalent rotavirus strain (35.2%). The second most prevalent was the G9 type (31.2%), followed by G2 (4.0%), G3 (3.5%), G4 (2.2%), mix infection (1.8%) and G12 (0.5%). The more frequent association was P[8]G1 and P[8]G9. We performed a sequence analysis of 38 P[8]G1 rotavirus strains, selected from a total of 341 P[8]G1. Two strains from 1997, 1998, 2001, and 2002 were analyzed; three strains from 1996, 1999, and 2003; four strains from 2000; seven strains from 2004, and 2005; and five strains from 2006. All 38 rotavirus G1 sequence in this study were found to be classified into two distinct lineages, lineage I with 44.7% (17/38) and lineage II with 55.3% (21/38). The G1-I lineages were detected during six rotavirus seasons 1996-1997, 2001-2002, and 2004-2006 whereas and lineage G1-II was detected during 1998-2001, and 2003-2005. Preliminary analyses

demonstrated that Rotarix[®] has been efficacious against these G1 lineages.

Keywords: Rotavirus. Diarrhea. Genotypes. Genetic diversity. Phylogenetic Analysis. Lineages. Vaccine.

.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Partícula de rotavírus observada ao microscópio eletrônico JEOL JEM-1011.....	20
Figura 2 -	Representação esquemática dos segmentos genômicos e estrutura tridimensional em 3D da partícula viral de Rotavírus-A Símio (SA11).....	23
Figura 3 -	Representação esquemática da estrutura do gene dos RVs.....	34
Figura 4 -	Demonstração esquemática do padrão de migração eletroforética dos segmentos de amostras de rotavírus dos grupos A a G.....	35
Figura 5 -	Distribuição dos genótipos de rotavírus no Brasil por região geográfica.....	59
Figura 6 -	Demonstração esquemática do <i>reassortant</i> entre amostras de RV animal e humana na produção da vacina tetravalente humana com VP7 sorotipos específicos.....	64
Figura 7 -	Distribuição sazonal de RVs detectados em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo, entre o período de 1996 e 2006.....	85
Figura 8 -	Distribuição de RVs de acordo com a faixa etária, em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo, entre o período de 1996 e 2006.....	86
Figura 9 -	Distribuição dos genótipos G (VP7) de rotavírus em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo, entre o período de 1996 e 2006.....	90
Figura 10 -	Distribuição dos genótipos P (VP4) de rotavírus em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo, entre 1996 a 2006.....	92
Figura 11 -	Distribuição dos genótipos P (VP4) de rotavírus em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo, entre 1996 a 2006.....	97
Figura 12 -	Amplificação do gene 9 (VP7) das amostras de rotavírus P[8]G1 por RT-PCR, canaletas correspondem às amostras 1 a 18; Padrão de tamanho molecular 100 pb (M).....	98
Figura 13 -	Amplificação do gene 9 (VP7) das amostras de rotavírus P[8]G1 por RT-PCR, canaletas correspondentes as amostras 19 a 38; Padrão de tamanho	

	molecular 100 pb (M).....	98
Figura 14 -	Eletoforese em gel de poliacrilamida de amostras de rotavírus genótipo G1. Canaletas 1 a 14: amostras de alguns RVs selecionados para sequenciamento; Wa: amostra de referência padrão G1.....	100
Figura 15 -	Eletoforese em gel de poliacrilamida. Eletoforótipos de amostras de rotavírus genótipo G1. Canaletas 15 a 29: amostras de alguns RVs selecionados para sequenciamento; Wa: amostra de referência padrão G1.....	100
Figura 16 -	Análise filogenética das sequências nucleotídicas parciais do gene que codifica a proteína VP7 de 38 amostras rotavírus G1. A amostra padrão ST-3 foi utilizada como grupo externo para enraizar a árvore. A árvore filogenética foi construída utilizando como critério Máxima Verossimilhança, cada ramo foi averiguado com procedimento estatístico de <i>bootstrap</i> , com 1.000 repetições.....	102
Figura 17 -	Distribuição temporal das linhagens G1 de rotavírus no Estado de São Paulo, entre 1996 e 2006.....	103
Figura 18 -	Comparação das regiões variáveis 3 a 5 (região A), 7 (região B), 8 (região C) e 9 (região F) das sequências de aminoácidos dos rotavírus (VP7) G1 do Estado de São Paulo e amostra de referência Wa.*Lin: Linhagem.....	106
Figura 19 -	Eletoferograma parcial da sequência da amostra de RV IALR280 (mudança de aa D213N), obtida no sequenciador automático ABI Prism 3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems, Inc.....	108
Figura 20 -	Eletoferograma parcial da sequência da amostra de RV IALR280 (mudança de aa D213N), obtida no sequenciador automático ABI Prism 3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems, Inc.....	109

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação genotípica de RVs-A de origem humana com base na proteína.	27
Quadro 2 - Genótipos dos 11 segmentos genômicos do rotavírus, segundo porcentagem de identidade dos nucleotídeos das <i>ORFs</i>	29
Quadro 3 - Proposta de classificação e nomenclatura para as proteínas estruturais e não estruturais, codificadas pelos 11 genes de cepas padrões de rotavírus humanos e animais.	30
Quadro 4 - Segmentos genômicos dos rotavírus e a função das proteínas.....	32
Quadro 5 - Vacinas orais contra rotavírus atualmente licenciadas e em desenvolvimento.....	68
Quadro 6 - Sequências de <i>primers</i> empregadas na RT-PCR para caracterização em genótipos P (VP4) das amostras de RVs-A.....	76
Quadro 7 - Sequências de <i>primers</i> empregadas na RT-PCR para caracterização em genótipos G (VP7) das amostras de RVs-A.....	77
Quadro 8 - Amostras padrões utilizadas no estudo para análise filogenética contendo número de acesso no NCBI, hospedeiro, genótipo do RV-A e país de origem.	83
Quadro 9 - Análise das amostras fecais de 41 casos provenientes de 8 surtos de diarreia em diferentes municípios do Estado de São Paulo, entre 2004 e 2006.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências de <i>primers</i> empregadas no sequenciamento do gene 9 (VP7) das amostras de RVs-A selecionadas.....	82
Tabela 2 - Distribuição temporal de RVs detectados em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo, entre o período de 1996 e 2006.....	84
Tabela 3 - Distribuição temporal dos genótipos G (VP7) de rotavírus em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo, entre o período de 1996 e 2006.....	89
Tabela 4 - Distribuição de mistura de genótipos G (VP7) de rotavírus em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo.....	90
Tabela 5 - Distribuição de mistura de genótipos P (VP4) de rotavírus em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo.....	91
Tabela 6 - Distribuição temporal da associação P (VP4) e G(VP7) de rotavírus em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo, entre o período de 1996 a 2006.....	93
Tabela 7 - Surtos de diarreia no Estado de São Paulo, período de 2004 e 2006.....	95
Tabela 8 - Amostras de RVs caracterizadas como P[8]G1 e selecionadas para reação de sequenciamento, entre 1996 e 2006.....	99
Tabela 9 - Alterações observadas nas regiões variáveis VR4 das amostras de rotavírus linhagens VP7 G1.	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ L: microlitro

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: base nitrogenada

dsRNA: fita dupla de ácido ribonucleico

EDTA: ácido etileno-diamino-tetracético

EGPA: eletroforese em gel de poliacrilamida

ELISA: *enzyme linked immunosorbent assay*

et al.: e colaboradores

g: aceleração da gravidade

IME: imunomicroscopia eletrônica

MED: microscopia eletrônica direta

mg: miligrama

min.: minuto

mL: mililitro

nm: nanômetro

NaOH: hidróxido de sódio

NS: não estrutural

PBS: solução tampão fosfato

PCR: reação em cadeia pela polimerase

RNA: ácido ribonucleico

RT-PCR: transcriptase reversa-reação cadeia pela polimerase.

RRV: rotavírus macaco rhesus

SDS: *sodium dodecyl sulphate*

TEMED: *N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine*

TRIS: hidroximetil-aminometano

TBE: tris-borato-EDTA

VR: região variável

VP: proteína viral

ORF: Fase aberta de leitura

OBS: Algumas abreviaturas utilizadas no presente trabalho são utilizadas na grafia no idioma inglês, devido ao seu uso consagrado na literatura científica.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	CONSIDERAÇÕES.....	18
1.2	HISTÓRICO.....	19
1.3	PARTÍCULA DOS ROTAVÍRUS.....	21
1.4	CLASSIFICAÇÃO.....	24
1.5	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.....	31
1.6	ORGANIZAÇÃO DO GENOMA.....	31
1.7	TRANSMISSÃO.....	43
1.8	REPLICAÇÃO E PATOGÊNESE.....	44
1.9	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	46
1.10	IMUNIDADE.....	47
1.11	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	49
1.12	EPIDEMIOLOGIA.....	52
1.13	TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLE.....	60
2	OBJETIVOS.....	70
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
3.1	MATERIAIS.....	71
3.1.1	Amostras clínicas (fezes).....	72
3.1.2	Amostras de rotavírus.....	72
3.2	MÉTODOS.....	72
3.2.1	Preparo das suspensões de fezes.....	72
3.2.2	Ensaio imunoenzimático para a detecção de RVs-A.....	72
3.2.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	73

3.2.3.1	<i>Extração do ácido nucléico dos rotavírus.....</i>	73
3.2.3.2	<i>Preparo do gel de poliacrilamida.....</i>	74
3.2.4	Caracterização molecular das amostras de RVs-A em G (VP7) e P (VP4) por transcrição reversa - reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR).....	75
3.2.4.1	<i>Identificação da amostra.....</i>	76
3.2.4.2	<i>Extração RNA viral – Método TRIZOL.....</i>	77
3.2.4.3	<i>RT-PCR.....</i>	78
3.2.4.4	<i>Semi Nested – PCR (Genotipagem)</i>	79
3.2.4.5	<i>Análise por eletroforese em gel de agarose.....</i>	80
3.2.5	Identificação de surto de diarreia.....	80
3.2.6	Sequenciamento do gene 9 (VP7)	81
3.2.6.1	<i>Alinhamento.....</i>	82
3.2.6.2	<i>Inferência filogenética.....</i>	82
4	RESULTADOS.....	84
4.1	DETECÇÃO DE RV-A.....	84
4.2	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS RVS EM GENÓTIPOS G (VP7) E P(VP4).....	86
4.2.1	Associação P(VP4) e G(VP7) dos RVs.....	92
4.3	IDENTIFICAÇÃO DE SURTOS DE DIARRÉIA POR ROTAVÍRUS. ...	94
4.3.1	Surtos de diarreia nos municípios do Estado de São Paulo.....	94
4.4	SEQUENCIAMENTO DO GENE 9 VP7 G1.....	98
5	DISCUSSÃO.....	110
6	CONCLUSÕES.....	141

REFERÊNCIAS.....	144
ANEXO A - Artigo publicado.....	182

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES

A diarreia aguda é considerada uma doença comum no mundo inteiro, porém nos países em desenvolvimento a doença assume um significado especial, constituindo a principal causa de morbidade e mortalidade em crianças menores de 5 anos de idade (KOSEK; BERN; GUERRANT, 2003). A morbi-mortalidade devido à doença diarreica diminuiu consideravelmente na década de 70 em diversos países. No Brasil, este fato ocorreu em função da implementação gradativa de políticas públicas de saúde, como melhorias no saneamento básico doméstico, abastecimento de água potável, incentivo ao aleitamento materno, e melhora no estado nutricional das crianças. Uma das mais importantes intervenções foi a introdução e utilização crescente da terapia de reidratação oral (TRO). Esta ação de baixo custo representou grande impacto na redução da mortalidade por desidratação causada por diarreia aguda. Entretanto, apesar destas ações, a doença ainda representa uma preocupação e um problema em saúde pública (BLACK; MORRIS; BRYCE, 2003; SASTRY e BURGARD, 2005).

Estima-se a ocorrência de 1 bilhão de episódios de diarreia e aproximadamente de 3 a 5 milhões de mortes anualmente (LINHARES e BREESE, 2000). Também nos países desenvolvidos, a diarreia aguda apresenta taxa de morbidade considerável e um número substancial de hospitalizações em crianças menores de 2 anos de idade (HO et al., 1988; KOSEK et al., 2003; PARASHAR; BRESEE; GLASS, 2003).

A etiologia da diarreia aguda na infância pode estar relacionada com diversos agentes infecciosos como vírus, bactérias e parasitas, ou agentes não infecciosos (CICERELLO e GLASS, 1994). Dentre os agentes infecciosos, os rotavírus (RVs)

são considerados os principais agentes etiológicos da diarreia aguda grave.

1.2 HISTÓRICO

Os primeiros relatos relacionados à participação de agentes virais em doenças diarreicas ocorreram em 1943 por Ligth e Hodes. Os autores induziram a doença diarreica em bezerros jovens, através da inoculação por via oral, utilizando filtrado de fezes de crianças com quadro de diarreia não bacteriana, ocorrido em 1942 durante 4 surtos em berçários de Baltimore e Washington. Depois de 32 anos, as fezes liofilizadas desses animais foram submetidas à microscopia eletrônica direta, ainda sendo observadas partículas típicas de RVs (HODES, 1977). Em 1969, Mebus et al. utilizando a microscopia eletrônica, demonstraram a presença de partículas virais de 70 nanômetros (nm) de diâmetro, em fezes de bezerros com a doença diarreica, e que a mesma poderia ser reproduzida, por meio de inoculações seriadas por via oral.

Até o início da década de 70, as técnicas utilizadas para diagnosticar as diarreias agudas em humanos eram limitadas aos agentes bacterianos e parasitários e a maioria não podia ser identificada (LE BARON et al., 1990).

Finalmente, em 1972, Kapikian et al. utilizando a técnica de imunomicroscopia eletrônica, demonstraram a presença de partículas virais com 27 nanômetros de diâmetro em filtrado de fezes de adultos voluntários, que ingeriram filtrados de fezes diarreicas durante um surto de diarreia não bacteriana ocorrido em Norwalk, Ohio, EUA. Estes vírus foram denominados de vírus Norwalk, que representa um grupo diverso de vírus, atualmente classificado na família *Caliciviridae* (HEDBERG e OSTERHOLM, 1993; WANG et al., 1994; LEVETT et al., 1996; INTERNATIONAL COMMITTEE TAXONOMY OF VIRUSES, 2006).

No ano seguinte, em 1973, Bishop et al. descreveram pela primeira vez a

presença de RVs em humanos, através de cortes ultrafinos de biópsia da mucosa duodenal de crianças com diarreia aguda não bacteriana. Utilizando a microscopia eletrônica, os autores observaram a presença de partículas virais em 6 dos 9 casos estudados e devido à sua morfologia sugeriram tratar-se de um vírus pertencente ao grupo Orbivírus. No mesmo ano, Flewett, Bryden; Davis observaram pela primeira vez por microscopia eletrônica, partículas de vírus diretamente nas fezes de crianças com diarreia aguda. Eram partículas com duplo capsídeo, tornando-as muito semelhantes aos Reovírus. Em 1974, Flewett; Bryden; Davis sugeriram a denominação de Rotavírus, anteriormente denominada de *Reovirus-like*, pois as partículas virais apresentavam morfologias semelhantes a uma roda (latim “rota”), quando observadas ao microscópio eletrônico (Figura 1). Essa denominação, como gênero Rotavírus, viria a ser definida como oficial em 1978 pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (I.C.T.V.) durante o 4^o Congresso Internacional de Virologia (MATTHEWS et al., 1979).

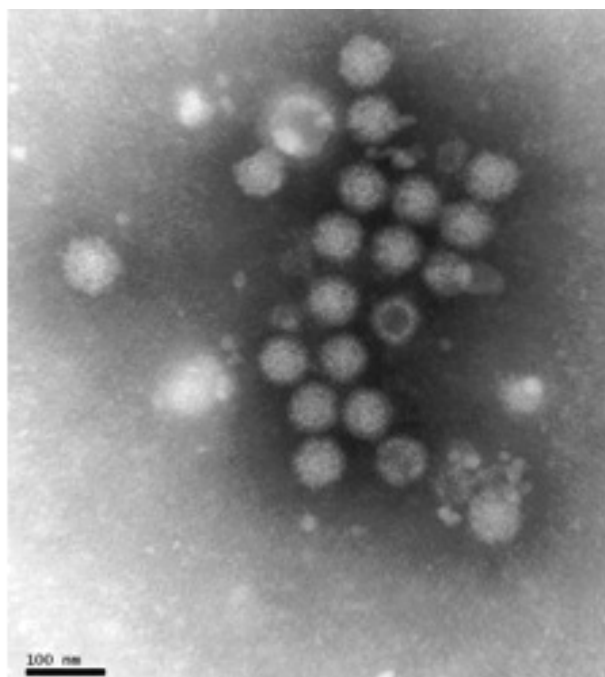


Figura 1. Partícula de rotavírus observada ao microscópio eletrônico JEOL JEM-1011.

FONTE: Foto gentilmente cedida por Dra. Marli Ueda, Seção de Microscopia Eletrônica, Instituto Adolfo Lutz.

Diversos vírus têm sido reconhecidos como agentes etiológicos das doenças diarreicas, porém, somente alguns são considerados de importância epidemiológica além dos rotavírus, como Norovírus e Sapovírus (*Caliciviridae*), Astrovirus (*Astroviridae*) e Adenovírus (*Adenoviridae*) (WILHELMI et al., 2003).

A primeira descrição da ocorrência dos RVs no Brasil foi feita por Linhares et al., (1977). Utilizando a técnica de microscopia eletrônica, os autores demonstraram a presença de partículas de rotavírus nas fezes de 2 de 13 crianças com diarreia aguda admitidas em um Hospital Público na cidade de Belém do Pará. Ao longo dos trinta anos, diversos estudos associados a infecção por esses vírus foram objeto de estudo em nível nacional, integrando um espectro que abrange desde os primeiros achados por microscopia eletrônica até a caracterização molecular das cepas circulantes (LINHARES e BRESSE, 2000).

1.3 PARTÍCULA DOS ROTAVÍRUS

O RV pertence à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*. A partícula íntegra apresenta aproximadamente 100 nm de diâmetro, um nucleocapsídeo icosaédrico e sem envoltório. Possui uma tripla camada protéica compondo os capsídeos externo, intermediário e interno. O *core* que contém o genoma viral encontra-se na camada mais interna, apresentando um diâmetro aproximado de 37 nm.

O seu genoma é constituído de onze segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA). Cada segmento genômico codifica uma proteína viral específica, ou seja, 6 proteínas estruturais, designadas com as iniciais em inglês VP, "Viral Protein" (VP1-VP4, VP6 e VP7); e 6 proteínas não estruturais - NSP, "No Structural Protein"

(NSP1-NSP6). São denominadas de monocistrônicas, com exceção do segmento genômico 11 que codifica duas proteínas, NSP5 e NSP6 (ESTES e KAPIKIAN, 2007; RAMIG, 2004) Figura 2.

A camada mais interna ou o *core* é constituída por 60 dímeros da proteína viral VP2, codificada pelo segmento genômico 2. A VP2 por sua vez interage com as proteínas virais VP1 e VP3, codificadas pelos segmentos genômicos 1 e 3, respectivamente, organizadas na forma de 12 complexos enzimáticos e ligadas diretamente ao genoma viral (PRASAD e CHIU, 1994; SHAW et al., 1993).

A camada intermediária da partícula de rotavírus é constituída por 260 trímeros da proteína VP6, a qual circunda o *core*, codificada pelo segmento genômico 6, representando cerca de 51% do virion (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

O capsídeo externo da partícula de rotavírus consiste em 2 proteínas estruturais: VP4 e VP7.

A proteína VP4 é codificada pelo segmento genômico 4, constituindo cerca de 1,5% da proteína total do virion. (KAPIKIAN e ESTES, 2007). A proteína VP4 projeta-se do capsídeo externo da partícula viral em forma de pequenas espículas (SHAW et al., 1993). A proteína está associada a várias funções importantes como: indução na produção de anticorpos neutralizantes; atividade hemaglutinante; restrição do crescimento do rotavírus de origem humana em culturas de células; é o sítio para ativação da infecciosidade por clivagem proteolítica; contém o peptídeo de fusão dos rotavírus; e está associada à virulência. A clivagem proteolítica divide a proteína VP4 em duas subunidades protéicas indicadas com asterisco: VP5* e VP8*. A subunidade VP5* está associada à neutralização heterotípica, enquanto a VP8* está associada à neutralização homotípica (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

A proteína VP7, uma glicoproteína, é considerada o principal componente do capsídeo externo da partícula de rotavírus e constituindo cerca de 30% do virion. A proteína é codificada pelos segmentos genômicos 7, 8 ou 9, dependendo da amostra de vírus, apresentando um papel importante na indução de produção de anticorpos neutralizantes (ESTES e COHEN, 1989).

As proteínas NSP1 e NSP4 são codificadas pelos segmentos 5 e 10, respectivamente, as proteínas NSP5 e NSP6 são codificadas pelo segmento genômico 11 e as proteínas NSP3 e NSP2 são codificadas pelos segmentos 7, 8 ou 9, dependendo da amostra de vírus. As proteínas NSP1 -NSP3 e NSP5 parecem apresentar propriedades de ligação a ácidos nucléicos, atividades de replicase e estão envolvidas na replicação do genoma viral (ESTES e COHEN, 1989; ESTES e KAPIKIAN, 2007). A proteína NSP4 foi descrita como sendo uma enterotoxina viral (BALL et al., 1996) (Figura 2).

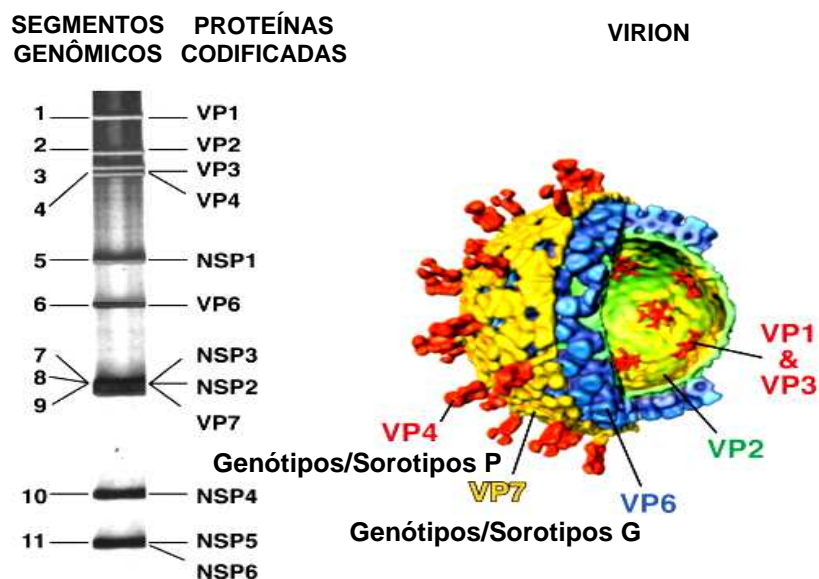


Figura 2. Representação esquemática dos segmentos genômicos e estrutura tridimensional em 3D da partícula viral de Rotavírus-A Símio (SA11).
 FONTE: Adaptado de Desselberger et al. (2009).

1.4 CLASSIFICAÇÃO

Os rotavírus são classificados dentro de três importantes especificidades antigênicas com base no grupo, subgrupo e sorotipo (HOSHINO e KAPIKIAN, 1994a; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

A especificidade do grupo é determinada predominantemente pela proteína VP6, classificando o rotavírus sorologicamente em 7 grupos (A - G). Os rotavírus dos grupos A (RVs-A), B e C são encontrados tanto em humanos como em animais e os demais grupos (D - G) são encontrados apenas em animais. As cepas pertencentes aos grupos B, C, D, E, F e G são denominados como RVs do grupo-não A. O RV-A constitui a maioria dos rotavírus e é considerado o principal agente causador das gastroenterites graves em crianças e animais (ESTES e KAPIKIAN, 2007; SANTOS e HOSHINO, 2005).

O rotavírus do grupo B, inicialmente relacionado à diarreia animal, foi implicado como causa de vários surtos de gastroenterites graves ocorridos na China, envolvendo predominantemente adultos e em recém-nascidos e, mais tarde, a quadros diarreicos em adultos na Índia, Bangladesh e Myanmar (KRISHNAN et al., 1999; AHMED et al., 2004; BARMAN et al., 2006; KOBAYASHI et al., 2001; CHEN et al. 1985; FANG et al., 1989; HUNG et al., 1984; AUNG et al., 2009).

O rotavírus do grupo C, do mesmo modo inicialmente relacionado à diarreia em animais tem sido detectado de forma esporádica e surtos em humanos em diversos países (RODGER; BISHOP; HOLMES, 1982; DIMITROV et al., 1983; ESPEJO et al., 1984; ARISTA; GIOVANELLI; TITONE, 1985; SZUCS; KENDE; UJ, 1987; PEÑARANDA et al., 1989; USHIJIMA et al., 1989; JIANG et al., 1995; YEE et al., 2006, SANCHEZ – FAUQUIER et al., 2003; PHAN et al., 2004; STEYER et al., 2006; RAHMAN et al., 2005a, SCHNAGL et al., 2004; CAUL et al.; 1990; CASTELLO

et al., 2002; BÁNYAI et al., 2006); inclusive em algumas regiões no Brasil (PEREIRA et al., 1993; SOUZA et al., 1998; TEIXEIRA et al., 1998; GABBAY et al., 1999, 2008; LUCHS et al., 2009).

A especificidade de subgrupo do RV-A é definida pela proteína VP6, por ensaios imunoenzimáticos utilizando anticorpos monoclonais específicos. Até o momento, quatro subgrupos específicos são descritos: subgrupo I (comum em animais e pouco freqüente em humanos); subgrupo II (comum em humanos e pouco freqüente em animais); subgrupo I e II (pouco freqüente em humanos ou animais) e subgrupo não I não II (pouco freqüente em humanos e animais e comum em aves) (HOSHINO e KAPIKIAN, 1994a). Anteriormente, os subgrupos específicos das amostras de RV-A eram determinados pela análise do genoma viral, utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Determinam 2 padrões eletroforéticos distintos de acordo com a mobilidade dos segmentos 10 e 11: “longo” e “curto”. Amostras de rotavírus com padrão eletroforético “longo”, estão freqüentemente associadas ao subgrupo II e amostras com padrão eletroforético “curto”, estão freqüentemente associadas ao subgrupo I (ESTES; GRAHAM; DIMITROV, 1984; ESTES e KAPIKIAN, 2007). Porém, estudos demonstram exceções a estas associações, ou seja, amostras de rotavírus pertencentes ao subgrupo I com um padrão eletroforético “longo” e amostras pertencentes ao subgrupo II com um padrão eletroforético “curto” (HOSHINO e KAPIKIAN 1994b).

A especificidade de sorotipo do RV-A é determinada pelas proteínas VP7 e VP4, que induzem de forma independente a produção de anticorpos neutralizantes (HOSHINO et al., 1985; OFFIT et al., 1985, 1986). Para facilitar a descrição dos rotavírus em sorotipos, sugeriu-se uma terminação binária: para os sorotipos específicos VP7 utiliza-se a letra **G** (por ser uma glicoproteína), para os sorotipos

específicos VP4 utiliza-se a letra **P** (por ser sensível à protease).

O critério estabelecido para se determinar um novo sorotipo VP7 ou VP4 está ligado à demonstração da diferença de 20 vezes ou mais no título de anticorpos neutralizantes entre o sorotipo de referência e o novo sorotipo. Alternativamente, pode-se empregar a análise comparativa da sequência dos aminoácidos dos genes do RNA viral que codificam as proteínas VP7 e VP4, e para que as amostras pertençam ao mesmo genótipo, estas devem apresentar pelo menos 89% ou mais de homologia (HOSHINO e KAPIKIAN, 1994a; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Para definir a especificidade em sorotipos determinada pela proteína VP4 são utilizadas na literatura duas classificações: genótipos P (idealizada por ESTES e COHEN, 1989) e sorotipos P (idealizada por GORZIGLIA et al., 1990). Os sorotipos P e os genótipos P são determinados como descrito anteriormente, porém não há relação entre os resultados obtidos nas duas metodologias utilizadas, tornando difícil a classificação e o seu entendimento, ao contrário dos sorotipos e genótipos G (ESTES e COHEN, 1989). Recomenda-se que os genótipos P sejam colocados entre colchetes seguidos da designação completa do sorotipo P (ex. a amostra padrão humana DS-1 deve ser designada como P1B[4], G2) e para aquelas amostras que não apresentam sorotipo P definido colocar apenas o genótipo entre colchetes (ex. a amostra humana padrão DHAKA6 deve ser designada como P[25] G11).

Com base em testes sorológicos, até o momento foram descritos em humanos e animais 14 P e 14 sorotipos G, e com base na caracterização molecular, pelo menos, 30 P e 21 genótipos G (ABE et al., 2009) Desses, 11 G tipos (G1-G6 e G8-G12) e 12 P tipos (P1 [8], P1B [4], P2A [6], P2C [6], P3 [9], P4 [10], P5A [3], P6 [1], P8 [11], P11 [14], P12 [19] e P [25]) têm sido isolados de seres humanos

(MATTHIJNSSENS et al., 2008a).

Como as amostras de rotavírus humanos e animais possuem duas especificidades para sorotipos, sugere-se que a caracterização antigênica completa dos rotavírus inclua tanto a proteína VP7 como a proteína VP4 (HOSHINO et al., 1985), como consta no quadro 1.

Quadro 1 - Classificação genotípica de RVs-A de origem humana com base na proteína VP4.

VP4 Genótipo	VP7 Sorotipo/Genótipo	Cepas de Origem Humana
P[6]	G1	M37
P[8]	G1	Wa, KU, Dhaka 16-03, D
P[9]	G1	K8
P[4]	G2	DS1, TB-Chen, NR1, S2, RV5, RMC/G66, KUN, E210, AU85, AU102.
P[6]	G2	1076
P[3]	G3	PA260/97
P[6]	G3	RV3
P[8]	G3	YO, RMC437, P, Ai-75, CH32, CHW2, MO
P[9]	G3	Au-1, "02-92",
P[14]	G3	B4 106
P[4]	G4	RMC61
P[6]	G4	ST3
P[8]	G4	Hosokawa, RMC 100, Hochi, VA70, Odelia
P[8]	G5	IAL28
P[6]	G6	B1711
P[9]	G6	Se584
P[14]	G6	Hun5, PA169, 11/05-27, B10925-97
P[1]	G8	MP409
P[6]	G8	DRC86
P[8]	G8	DRC88
P[10]	G8	69M
P[6]	G9	US1205
P[8]	G9	WI61, B3458, F45
P[11]	G9	116E
P[19]	G9	RMC321, RMC/G7, Mc323, Mc345
P[11]	G10	I321
P[14]	G10	A64
P[25]	G11	Dhaka6, KTM368
P[4]	G12	L26
P[6]	G12	Dhaka12-06, Matlab13-03, N26-02, RV176-00, RV161-00
P[8]	G12	B4633-03, Dhaka25-02
P[9]	G12	T152

Nota: As amostras de origem humana são indicadas de acordo com o nome dado pelo local aonde foram isoladas as amostras.

FONTE: Adaptado de Matthijnsens et al. (2008a); Estes e Kapikian (2007).

Estudos utilizando técnicas de hibridização classificam os rotavírus dentro de famílias de genes ou genogrupos. Pela análise do número de segmentos genômicos do vírus é possível observar a formação ou não de bandas híbridas estáveis entre as amostras padrões utilizadas. Até o momento 3 genogrupos foram descritos em amostras de rotavírus humanos, são eles: Wa, DS-1 e AU-1 e vários em animais. Estes estudos indicam que a transmissão de rotavírus entre as espécies é provavelmente rara. Entretanto, há relatos que indicam homologia genética entre os genogrupos das espécies animal e humana, sugerindo que a diversidade gênica desses vírus seja devida à ocorrência de um rearranjo genético natural entre as amostras de rotavírus (WARD et al., 1990; NAKAGOMI e NAKAGOMI, 1991).

Recentemente uma nova recomendação tem sido proposta para classificação dos RVs-A, idealizada pelo Grupo de trabalho da Classificação dos Rotavirus em parceria com o Grupo de Estudo *Reoviridae*, do Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (MATTHIJNSSENS et al., 2008a). Com base na porcentagem de identidade dos nucleotídeos foram definidos diferentes genótipos para todos os 11 segmentos genômicos do vírus, incluindo as proteínas VP1 a VP3, e proteínas NSP1 a NSP3 e NSP5/6 (MATTHIJNSSENS et al., 2008b). O novo sistema de classificação baseia-se na análise comparativa (valor do *cut-off*), da porcentagem de identidade da sequência completa de nucleotídeos da fase aberta de leitura (*open reading frame – ORF*) com outras sequências de cepas padrões disponíveis no GenBank. Portanto a sequência de nucleotídeos da *ORF* de todos os segmentos genômicos de uma cepa de rotavírus deve ser preferencialmente obtida de forma inequívoca, permitindo definir ou classificá-la em um dos genótipos já conhecidos ou em um novo genótipo, como demonstra o

quadro 2.

Quadro 2 - Genótipos dos 11 segmentos genômicos do rotavírus, segundo porcentagem de identidade dos nucleotídeos das ORFs.

Proteína	Porcentagem de Identidade. Valor cut-off (%)	Número de Genótipos descritos	Nome do Genótipo
VP7	80	21G	G licoproteína
VP4	80	30P	Sensível- P rotease
VP6	85	11I	Capsídeo I ntermediário
VP1	83	4R	RNA polimerase R NA - dependente
VP2	84	5C	Proteína do C ore
VP3	81	6M	M etiltransferase
NSP1	79	14A	A ntagonista Interferon
NSP2	85	5N	N TPase
NSP3	85	7T	<i>T</i> ranslation <i>e</i> nchancer
NSP4	85	11E	E nterotoxina
NSP5	91	6H	<i>p</i> H osphoprotein

FONTE: Adaptado de Matthijnssens et al. (2008a).

A provável nova nomenclatura para comparação do genoma completo dos rotavírus foi considerada utilizando as seguintes notações: Gx-P[x]-Ix-Rx-CX-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx usados para os genes das proteínas VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP5/6, respectivamente. No quadro 3 demonstra-se algumas amostras padrões de RV-A com a nova proposta de classificação e nomenclatura.

Quadro 3 - Proposta de classificação e nomenclatura para as proteínas estruturais e não estruturais, codificadas pelos 11 genes de cepas padrões de rotavírus humanos e animais.

Amostra Padrão	Hospedeiro	VP7		VP4		VP6		VP1		VP2		VP3		NSP1		NSP2		NSP3		NSP4		NSP5
Wa	Humano	G1	-	P[8]	-	I1	-	R1	-	C1	-	M1	-	A1	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
Ku	Humano	G1	-	P[8]	-	I1	-	R1	-	C1	-	M1	-	A1	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
Dhaka 16-03	Humano	G1	-	P[8]	-	I1	-	R1	-	C1	-	M1	-	A1	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
D	Humano	G1	-	P[8]	-	I1	-	R1	-	C1	-	M1	-	A1	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
P	Humano	G3	-	P[8]	-	I1	-	R1	-	C1	-	M1	-	A1	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
ST3	Humano	G4	-	P[6]	-	I1	-	R1	-	C1	-	M1	-	A1	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
IAL28	Humano	G5	-	P[8]	-	I1	-	R1	-	C1	-	M1	-	A1	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
WI61	Humano	G9	-	P[8]	-	I1	-	R1	-	C1	-	M1	-	A1	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
B3458	Humano	G9	-	P[8]	-	I1	-	R1	-	C1	-	M1	-	A1	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
RMC321	Humano	G9	-	P[19]	-	I5	-	R1	-	C1	-	M1	-	A1	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
Dhaka12-03	Humano	G12	-	P[6]	-	I1	-	R1	-	C1	-	M1	-	A1	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
Matlab 13-03	Humano	G12	-	P[6]	-	I1	-	R1	-	C1	-	M1	-	A1	-	N1	-	T2	-	E1	-	H1
B4633-03	Humano	G12	-	P[8]	-	I1	-	R1	-	C1	-	M1	-	A1	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
Dhaka25-02	Humano	G12	-	P[8]	-	I1	-	R1	-	C1	-	M1	-	A1	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
DS1	Humano	G2	-	P[4]	-	I2	-	R2	-	C2	-	M2	-	A2	-	N2	-	T2	-	E2	-	H2
TB-Chen	Humano	G2	-	P[4]	-	I2	-	R2	-	C2	-	M2	-	A2	-	N2	-	T2	-	E2	-	H2
B1711	Humano	G6	-	P[6]	-	I2	-	R2	-	C2	-	M2	-	A2	-	N2	-	T2	-	E2	-	H2
DRC86	Humano	G8	-	P[6]	-	I2	-	R2	-	C2	-	M2	-	A2	-	N2	-	T2	-	E2	-	H2
DRC88	Humano	G8	-	P[8]	-	I2	-	R2	-	C2	-	M2	-	A2	-	N2	-	T2	-	E2	-	H2
69M	Humano	G8	-	P[10]	-	I2	-	R2	-	C2	-	M2	-	A2	-	N2	-	T2	-	E2	-	H2
L26	Humano	G12	-	P[4]	-	I2	-	R2	-	C2	-	M1/M2	-	A2	-	N1	-	T2	-	E2	-	H1
N26-02	Humano	G12	-	P[6]	-	I2	-	R2	-	C2	-	M2	-	A2	-	N1	-	T2	-	E6	-	H2
RV176-00	Humano	G12	-	P[6]	-	I2	-	R2	-	C2	-	M2	-	A2	-	N2	-	T2	-	E6	-	H2
RV161-00	Humano	G12	-	P[6]	-	I2	-	R2	-	C2	-	M2	-	A2	-	N2	-	T2	-	E1	-	H2
AU-1	Humano	G3	-	P[9]	-	I3	-	R3	-	C3	-	M3	-	A3	-	N3	-	T3	-	E3	-	H3
T152	Humano	G12	-	P[9]	-	I3	-	R3	-	C3	-	M3	-	A12	-	N3	-	T3	-	E3	-	H6
NCDV-Lincoln	Bovino	G6	-	P[1]	-	I2	-	R2	-	C2	-	M2	-		-	N2	-	T6	-	E2	-	
BRV033	Bovino	G6	-	P[1]	-	I2	-	R2	-	C2	-	M2	-	A3	-	N2	-	T6	-	E2	-	H3
RF	Bovino	G6	-	P[1]	-	I2	-	R2	-	C2	-	M2	-	A3	-	N2	-	T6	-	E2	-	H3
UK	Bovino	G6	-	P[5]	-	I2	-	R2	-	C2	-	M2	-	A3	-	N2	-	T7	-	E2	-	H3
WC3	Bovino	G6	-	P[5]	-	I2	-	R2	-	C2	-	M2	-	A3	-	N2	-	T6	-	E2	-	H3
KJ44	Bovino	G5	-	P[1]	-	I1	-	R1	-	C1	-	M2	-	A1	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
KJ75	Bovino	G5	-	P[5]	-	I1	-	R1	-	C1	-	M2	-	A1	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
A131	Povino	G3	-	P[7]	-	I5	-	R1	-	C2	-	M1	-	A1	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
Gottfried	Povino	G4	-	P[6]	-	I1	-	R1	-	C1	-	M1	-	A8	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
OSU	Povino	G5	-	P[7]	-	I5	-	R1	-	C1	-	M1	-	A1	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
A253	Povino	G5	-	P[7]	-	I5	-	R1	-	C2	-	M1	-	A1	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
YM	Povino	G11	-	P[7]	-	I5	-	R1	-	C1	-	M1	-	A8	-	N1	-	T1	-	E1	-	H1
PO-13	Ave	G18	-	P[17]	-	I4	-	R4	-	C4	-	M4	-	A4	-	N4	-	T4	-	E4	-	H4
SA11g4"O"	Simio	G3	-	P[1]	-	I2	-	R2	-	C5	-	M5	-	A5	-	N5	-	T5	-	E2	-	H5
SA11-5S	Simio	G3	-	P[1]	-	I2	-	R2	-	C5	-	M5	-	A5	-	N5	-	T5	-	E2	-	H5
SA11-30/19	Simio	G3	-	P[1]	-	I2	-	R2	-	C5	-	M5	-	A5	-	N5	-	T5	-	E2	-	H5
SA11-30/1A	Simio	G3	-	P[1]	-	I2	-	R2	-	C5	-	M5	-	A5	-	N5	-	T5	-	E2	-	H5
SA11-H96	Simio	G3	-	P[2]	-	I2	-	R2	-	C5	-	M5	-	A5	-	N5	-	T5	-	E2	-	H5
SA11-Both	Simio	G3	-	P[2]	-	I2	-	R2	-	C5	-	M5	-	A5	-	N2	-	T5	-	E2	-	H5

FONTE: Adaptado de Matthijssens et al. (2008b).

1.5 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

A infectividade do RV e integridade são mantidas quando expostas a ação de fluorocarbono, éter e cloroformio. São estáveis a temperatura de 56 °C e ao pH entre 3 e 9 (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001). Mantem a infectividade por longos períodos a 4 °C ou 20 °C, quando estabilizadas em $C aCl_2$ 1,5mM.

A infectividade do RV pode ser inativada com uso de desinfetantes como fenóis, formalina, cloro e betapropalactona. O etanol a 95% é o desinfetante mais efetivo para os RVs, atuando na remoção do capsídeo externo da partícula viral (KAPIKIAN et al., 2001).

Estudos realizados utilizando o RV em soluções de tampão fosfato têm demonstrado ação eficiente da irradiação por ultravioleta (U.V.) na inativação total da infectividade do vírus. No entanto, a influência da U.V. na presença de material sólido orgânico, como suspensões de fezes ou alimento, não foi avaliada (SMIRNOV et al., 1991).

1.6 ORGANIZAÇÃO DO GENOMA

O genoma do RV-A é constituído de onze segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA) e de polaridade positiva. O tamanho dos segmentos varia de 667 pb (segmento 11) a 3302 pb (segmento 1). O genoma total contém aproximadamente 18.552 pb, com peso molecular de $2,0 \times 10^5$ a $2,0 \times 10^6$ daltons (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Como o genoma dos rotavírus é naturalmente segmentado, pode ocorrer rearranjo entre cepas distintas gerando um novo vírus, conhecido como *reassortant*.

Rearranjo é um dos mecanismos importantes para geração da diversidade genética dos rotavírus, bem como para evolução do vírus (RAMIG et al., 1997; ABE et al., 2009).

Os 11 segmentos de várias cepas de rotavírus já foram sequenciados e o primeiro protótipo de rotavírus totalmente sequenciado foi a amostra Símia (SA11). No quadro 4 estão relacionadas todas as funções de cada uma das proteínas codificadas pelo segmento genômico do rotavírus.

Quadro 4 - Segmentos genômicos dos rotavírus e a função das proteínas.

Segmento Genômico Tamanho [pb]	ORFs	Proteína Viral (Protein Function)	Tamanho da proteína aa (Da)	Localização das proteínas na partícula viral	Função das proteínas
1 (3302)	18-3282	VP1 (Pol)	1088 (125005)	Core (capsídeo mais interno)	RNA polimerase RNA-dependente
2 (2690)	17-2659	VP2 (T1)	881 (102431)	Core (capsídeo mais interno)	Ligação do RNA/Formação Nucleocapsídeo
3 (2591)	50-2554	VP3 (Cap)	835 (98120)	Core (capsídeo mais interno)	Guanililtransferase Metiltransferase
4 (2362)	10 -2337	VP4	776 (86782)	Capsídeo externo	Hemaglutinina Antígeno de neutralização em tipos-P (sorotipos) Infectividade do vírus pela ação da tripsina clivando a VP4 em VP5* e VP8* Ligação das proteínas nas células
	-	VP5*	529 247-776 (60000)		
	-	VP8*	247 1-247 (28000)		
5 (1611)	31-1515	NSP1	495 (58654)	Não estrutural	Associado com citoesqueleto. Rica em cisteína Componente do pré core Ligação celular
6 (1356)	24-1214	VP6 (T13)	397 (4816)	Capsídeo intermediário	Principal proteína do virion. Compõe camada intermediária em forma de trímeros Hidrofóbica Determina antígenos de grupo e subgrupo
7 (1105)	26-970	NSP3	315 (34600)	Não estrutural	Ligação RNA, na região 3' do RNAm da partícula viral.
8 (1059)	47-997	NSP2 (VIP)	317 (36700)	Não estrutural	Ligação RNA. Provável participação na replicação RNA.

Continua

Conclusão

Segmento Genômico Tamanho [pb]	ORFs	Proteína Viral (Protein Function)	Tamanho da proteína aa (Da)	Localização das proteínas na partícula viral	Função das proteínas
9 (1062)	49-1026	VP7	326 [7368]	Capsídeo externo	Glicoproteína Antígeno de neutralização em G-tipos (sorotipos). Proteína transmembrana no RER Local de ligação Ca ²⁺ .
10 (751)	41-569	NSP4	175 (20290)	Não estrutural	Enterotoxina Glicoproteína transmembranica do RE Provável participação na morfogênese Local de Ligação Ca ²⁺ .
Segmento Genômico Tamanho [pb]	ORFs	Proteína Viral (Protein Function)	Tamanho da proteína aa (Da)	Localização das proteínas na partícula viral	Função das proteínas
11 (667)	22-615	NSP5	198 (21.725)	Não estrutural	Interage com a VP2, NSP2 e NSP6.
	80-355	NSP6	92 (11012)	Não estrutural I	Produto da segunda região ORF Interage com a NSP5. Localizada em viroplasma].

aa: aminoácido

FONTE: Adaptado de Estes (2001).

Cada segmento de RNA apresenta em sua extremidade 5' uma guanidina, seguido por um conjunto de nucleotídeos de sequências conservadas, não codificadoras, seguido pelo códon de iniciação e por um *ORF*, o qual codifica no mínimo uma proteína. No final de cada segmento há um conjunto de sequências não codificadoras, que por sua vez apresenta um conjunto de sequências conservadas terminais 3' finalizado com uma citidina 3', com um códon de parada. Quase todas as extremidades dos mRNAs com sequência consenso 5'-UGUGACC-3' contêm sinais para a expressão dos genes e replicação. Os comprimentos das sequências não codificadoras 3' e 5' variam para os diferentes genes, e não possuem cauda poliA na extremidade 3'. Todos os segmentos genômicos possuem pelo menos um *ORF* após o primeiro códon de iniciação para síntese protéica (AUG). Todos os segmentos

genômicos são monocistrônicos, com exceção do gene 11. Os dsRNA são pareados do início ao final no sentido positivo e contém uma sequência 5'cap m⁷GppG^(m) GPY (MATTION et al., 1991; ESTES e KAPIKIAN 2007). O empacotamento destes segmentos genômicos no capsídeo requer proteína-RNA interações (KAPAHNKE et al., 1986) (Figura 3).



Figura 3. Representação esquemática da estrutura do gene dos RVs.

FONTE: Adaptado de Estes (2001)..

AUG – Códon de iniciação para síntese protéica

5' – sequência intensificadora, extremidade guanidina

3' – sequência intensificadora, extremidade citosina

Os segmentos 1, 2, 3, 4, 6 e 9 codificam respectivamente as proteínas VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7, enquanto os segmentos 5, 7, 8 e 10 codificam as proteínas NSP1, NSP3, NSP2 e NSP4, respectivamente e o segmento 11 codifica as proteínas NSP5 e NSP6. A proteína VP7 é codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9 dependendo da amostra de RV.

O genoma segmentado do RV-A apresenta um padrão eletroforético de migração, quando este é submetido à eletroforese em gel de poliácridamida. Os onze segmentos são distribuídos em 4 classes, de acordo com sua ordem de migração e

peso molecular, são eles: Classe I (segmentos 1, 2, 3 e 4); Classe II (segmentos 5 e 6); Classe III (segmentos 7, 8 e 9) e Classe IV (segmentos 10 e 11), característicos do RV-A (4:2:3:2). Esses dois últimos segmentos caracterizam os padrões eletroforéticos “longo”, “curto” e “super curto”, de acordo com a maior ou menor velocidade de migração (LOURENÇO et al., 1981; MATSUNO et al., 1985; ESTES, 1996). Os segmentos 7, 8 e 9 apresentam aproximadamente o mesmo peso molecular, formando um *triplet* característico dos RVs-A, diferenciando-os dos outros rotavírus do grupo não A (RVs-não A) (Figura 4).

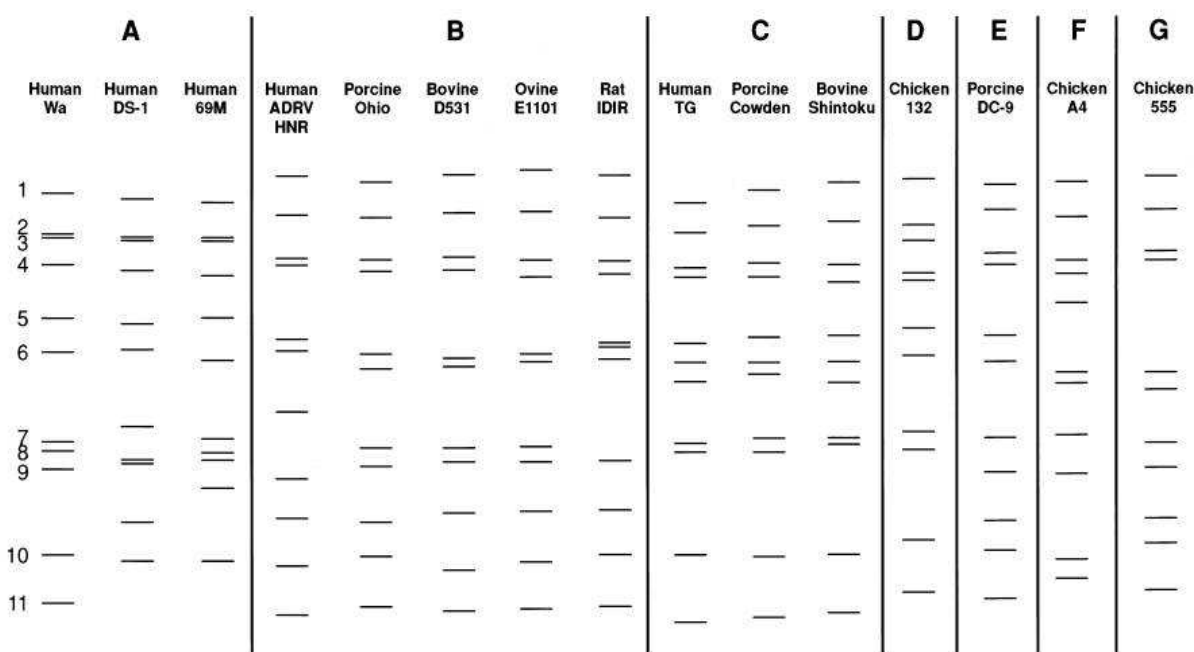


Figura 4. Demonstração esquemática do padrão de migração eletroforética dos segmentos de amostras de rotavírus dos grupos A a G.
 FONTE: Kapikian et al. (2001).

A diversidade de migrações eletroforéticas provavelmente ocorra devido a três diferentes mecanismos de evolução na natureza entre diferentes cepas do RVs em

diferentes hospedeiros, como pontos de mutações (*drift*), rearranjos genômicos (*shift*) e reestruturação (*reassortment*) (DESSELBERGER, 1996; TANIGUCHI e URASAWA, 1995; GOUVEA e BRANTLY 1995).

Provavelmente os rearranjos dos RVs ocorrem em função de erros no processo da transcrição pela RNA polimerase, RNA - dependente de um único segmento do genoma. O produto destes rearranjos genômicos surge provavelmente pela duplicação parcial do *ORF* dos RVs, ou sob a forma de deleção, migrando desta maneira de forma diferente na eletroforese em gel de policarilamida. (DESSELBERGER, 1996; DUNN et al., 1993).

Amostras de RVs consideradas não usuais sugerem a ocorrência de rearranjos naturais entre vários tipos de RVs humano ou rearranjos entre amostras de origem humana e animal (GOUVEIA e BRANTLY, 1995). Rearranjos genéticos também podem originar cepas de rotavírus com especificidades para dois sorotipos simultaneamente (TIMENETSKY et al., 1997; CIARLET; HIDALGO; LIPRANDI, 1996; NAGESHA et al., 1990).

1.6.1 Proteínas virais

1.6.1.1 Proteínas estruturais

a) Proteínas do capsídeo interno (*core*)

VP1: Proteína codificada pelo segmento genômico 1 do dsRNA viral, de maior peso molecular com 125 kDa, constituída por 1088 aminoácidos. É uma RNA polimerase. Além de sua função estrutural, participa do complexo enzimático que ativa a replicação dos rotavírus. Liga-se especificamente na extremidade 3' do mRNA com propriedades

semelhantes as RNA polimerases. No entanto, para atividade de replicação necessita da proteína VP2 (PATTON et al., 1997).

VP2: Proteína estrutural codificada pelo segmento genômico 2 do dsRNA viral. Possui peso molecular de 102kDa, constituída por 881 aminoácidos. Proteína mais abundante do core viral. Estudos demonstram que a VP2 é uma proteína imunogênica, e que os anticorpos para esta proteína sejam indicadores de infecção primária (SVENSSON et al., 1987.) Apresenta uma camada de densidade contínua onde estão as unidades morfológicas de 120 monômeros. É considerada essencial para atividade de replicase junto com a VP1, e sua função na replicação está associada à habilidade de se ligar ao mRNA. Análise com a técnica de crio microscopia eletrônica demonstrou que as proteínas VP1/VP3 estão ligadas a VP2 que por sua vez circunda o genoma do rotavirus. (LAWTON et al., 1997.)

VP3: Proteína estrutural codificada pelo segmento 3 do dsRNA viral, com peso molecular de 98 kDa e 835 aminoácidos. Apresenta atividade de helicase e metiltransferase associada a formação de estrutura da *cap* durante o processo de transcrição do mRNA. É uma guanililtransferase, pois se liga covalentemente a guanosina trifosfato - GTP(LIU; MATTION; ESTES, 1992).

b) Proteínas dos capsídeos interno (camada intermediária) e externo

VP4: Proteína estrutural do capsídeo externo codificada pelo segmento 4 do dsRNA viral, constitui cerca de 1,5% da proteína total do vírion. Proteína não glicosilada, apresentando peso molecular de 87 kDa, com 775 aminoácidos (rotavírus de origem

humana) e 776 aminoácidos (rotavírus de origem simia). Estudos utilizando técnica de criomicroscopia eletrônica demonstram que a proteína é representada por 60 estruturas que projeta em forma de pequenas espículas da superfície do capsídeo viral, cada qual formada por um dímero VP4 (LI et al., 2009; PRASAD et al., 1990; YEAGER et al., 1994).

A proteína está associada a várias funções importantes como: indução na produção de anticorpos neutralizantes sendo responsáveis pela determinação dos sorotipos/genótipos P; atividade hemaglutinante; restrição do crescimento do rotavírus de origem humana em culturas de células; é o sítio para ativação da infecciosidade por clivagem proteolítica; contém o peptídeo de fusão dos rotavírus; e está associada à virulência. A clivagem proteolítica divide a proteína VP4 em duas subunidades protéicas indicadas com asterisco: VP5* e VP8*.

A subunidade VP5* apresenta peso molecular de 60kDa e contém 529 aminoácidos. Está associada com a atividade de neutralização heterotípica e possui os epítomos responsáveis pela adsorção do vírus à célula com uma região variável e outra conservada. Da mesma maneira está associada com a restrição da replicação de certas amostras de RVs em cultura de células e associado à virulência em cepas animais (GREENBERG et al., 1983). Estudos demonstram que a subunidade VP5* induz de maneira mais eficaz a produção de anticorpos neutralizantes, conferindo imunidade protetora em seres humanos e animais, quando comparados com a VP8* (DUNN et al., 1995; OFFIT e BLAVAT, 1985, 1986).

A subunidade VP8* apresenta peso molecular de 28kDa e contém 247 aminoácidos. A maioria dos epítomos está associada às reações tipo-específico e localizada na região

hipervariável entre os aminoácidos residuais 71 e 24, e entre os aminoácidos residuais 84 e 180 correlacionados com os tipos P de VP4 (TANIGUCHI, 1989; LARRALDE et al., 1991).

Também possui três sítios antigênicos responsáveis pela reação cruzada entre diferentes VP4. O peptídeo B, localizado entre os aminoácidos residuais 84 a 180 contendo especificidades para sorotipos e subtipos; peptídeo A entre os aminoácidos residuais 1 a 102 e o C entre os aminoácidos residuais 150 a 246.

VP6: Proteína do capsídeo interno codificada pelo segmento genômico 6 do dsRNA viral, forma a camada intermediária do vírus, que por sua vez circunda o *core*. Apresenta peso molecular de 48kDa e contém 396 aminoácidos. Representa componente estrutural em maior quantidade, aproximadamente 51% do vírion. Desempenha um papel importante na organização geral da partícula viral ao interagir com as proteínas do capsídeo externo VP4 e VP7 e com a proteína do *core*, VP2, integrando a entrada de célula e transcrição endógena (PESAVENTO et al., 2006). É uma proteína hidrofóbica, imunogênica e altamente estável. Apresenta epítomos conservados, alvo para o diagnóstico laboratorial. A VP6 é a base para classificar os rotavírus em sete sorogrupos (A – G). Esta proteína também define a especificidade de subgrupo (SGI, SGII, SGI e II, SG não I e II) do RV-A por anticorpos monoclonais específicos, reconhecida entre os aminoácidos 296 a 259 e 305 (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2002).

VP7: Proteína estrutural codificada pelos segmentos genômicos 7, 8 ou 9, dependendo da amostra de RV e principal componente do capsídeo externo. É uma glicoproteína e a segunda mais abundante, constituindo aproximadamente 30% do vírion. Considerada altamente imunogênica possui importante papel na indução de anticorpos neutralizantes e responsáveis pela determinação de sorotipo-específico G (OFITT e BLAVAT, 1986).

Apresenta um peso molecular de 37 kDa e contém um *ORF* de 326 aminoácidos com dois códons de iniciação. Estes códons são precedidos por dois domínios hidrofóbicos denominados de H1 (entre os aminoácidos residuais 6 e 23) e H2 (entre os aminoácidos residuais 33 e 34) orientando a VP7 para o retículo endoplasmático. Na extremidade 3' do segmento genômico encontra-se um terceiro códon. Contem seis regiões consideradas sorotipo-específico, denominadas de A a F, constituída de aminoácidos altamente conservados entre as cepas do mesmo sorotipo, porém com variações entre cepas de diferentes sorotipos. Através da comparação da sequência deduzida de aminoácidos até o momento foram descritos 9 regiões antigênicas variáveis (VR) VR1 a VR9. As regiões variáveis VR5, VR7 e VR8 correspondem as regiões A, B e C, respectivamente, responsáveis pela codificação dos epítomos neutralizantes. A região A está localizada entre os aminoácidos residuais 87 e 101, a região B entre os aa residuais 143 e 152, e a região C entre os aa residuais 208 e 221, esta última considerada o sítio antigênico mais imunogênico da VP7. (ESTES e KAPIKIAN, 2007). Outras três regiões antigênicas foram descritas como a região D, corresponde ao aa 291; região E corresponde ao aa 190 e região F corresponde a VR9, localizada entre os aa residuais 235 e 242 (TRINH et al., 2007).

1.6.1.2 *Proteínas não estruturais*

O genoma do RV-A codifica outras seis proteínas consideradas não estruturais. Entre estas, cinco proteínas estão envolvidas na replicação do genoma viral (NSP1 a NSP3, NSP5 e NSP6), interagindo com o ácido nucléico e uma está associada à morfogênese viral (NSP4) (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

NSP1: Proteína codificada pelo segmento genômico 5 do dsRNA viral, apresenta peso molecular de aproximadamente 58kDa e contém 495 aminoácidos. A proteína tem sido detectada no citoplasma das células infectadas por rotavírus em baixas concentrações nos estágios iniciais da maturação, provavelmente em associação com citoesqueleto (HUA et al., 1994). Provavelmente apresenta atividade na replicação do RNA viral associada ao pré *core* (HUA et al., 1994; PATTON, 1986).

NSP2: Proteína codificada pelos segmentos genômicos 7, 8 ou 9 de dsRNA, dependendo da amostra de RV-A. Apresenta peso molecular de 36 kDa e contém 317 aminoácidos. É uma proteína altamente conservada, expressa em níveis elevados em células infectadas por RV. Possui atividade nucleotídeo trifosfatase (NTPase). É um componente intermediário da replicação, com atividade de replicase, interagindo com a RNA polimerase RNA - dependente (PATTON et al., 2006). Exerce importante papel na replicação genômica e na formação do viroplasma quando associada a VP1, sendo designada como matriz protéica do viroplasma (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

NSP3: Proteína codificada pelos segmentos genômicos 7, 8 ou 9 dependendo da

amostra de RV. Apresenta peso molecular de 36 kDa e contém 315 aminoácidos. A proteína está envolvida no reconhecimento específico de RNA viral, facilitando a tradução pela maquinaria celular. Este reconhecimento é realizado pelo fator de inicialização eucariótica (eIF4G) e a mensagem de poliadenilação por uma poli (A). O domínio N-terminal de NSP3 interage com a sequência consenso 3' do mRNA viral, enquanto o domínio C-terminal interage com o eIF4G para facilitar circularização dos mRNAs virais e seu caminho para os ribossomos para a síntese de proteína (PESAVENTO et al., 2006).

NSP4: Proteína codificada pelo segmento genômico 10, apresenta peso molecular de 20 kDa e contém 175 aminoácidos. É considerada uma glicoproteína transmembrana associado ao retículo endoplasmático. Apesar de não estar associada ao RNA viral durante a replicação, apresenta um papel importante na morfogênese viral e da mesma maneira na virulência por apresentar atividade de enterotoxina (BALL et al., 1996).

O NSP4 interage com receptor celular do epitélio intestinal promovendo o aumento de níveis de cálcio e a permeabilidade ao cloreto da membrana plasmática, o que potencializa a secreção de cloreto, induzindo diarreia secretora. (ESTES e KAPIKIAN, 2007; TIAN et al., 1994).

NSP5: Uma das proteínas codificada pelo segmento genômico 11, apresenta peso molecular de 22 kDa contendo 198 aminoácidos. É uma proteína ácida, rica em resíduos de serina e treonina, que formam dímeros. Liga-se eficientemente tanto ao ssRNA quanto ao dsRNA (VENDE; TARAPOREWALA; PATTON., 2002) sofre

fosforilação na célula infectada (WELCH; CRAWFORD; ESTES, 1989). O acúmulo de NSP5 no viroplasma sugere que a proteína esteja envolvida na replicação do genoma e montagem do núcleo. Contudo outras evidências indicam que talvez a sua atividade ligada ao RNA esteja conectada a supressão da ativação dsRNA da resposta antiviral.

NSP6: Proteína codificada pelo *ORF* do segmento genômico 11, apresenta peso molecular de 11 kDa contendo 92 aminoácidos. Considerada a menor proteína dos RV-A. É uma componente do viroplasma interagindo com a NSP5 (PESAVENTO et al., 2006).

1.7 TRANSMISSÃO

A transmissão dos rotavírus ocorre basicamente pela via fecal-oral, pessoa a pessoa e pela ingestão de água e alimentos contaminados (LINHARES et al., 1981; STUMOLLER et al., 1982). A possibilidade de transmissão por via aérea tem sido considerada (KAPIKIAN et al., 2001). A transmissão entre as espécies não tem sido documentada em condições naturais, porém tem sido descrito alto grau de homologia entre amostras de rotavírus animais e humanas, devido a rearranjos genéticos entre as espécies (GOUVEA e BRANTLY, 1995; NAKAGOMI e NAKAGOMI, 1993).

O período de incubação da infecção por rotavírus pode variar de 1 a 3 dias. Em seguida, a manifestação clínica da infecção é caracterizada pela presença de diarreia aquosa e abundante, por um período médio de 3 a 8 dias, podendo levar a desidratação e óbito (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

A alta infectividade dos RVs é revelada durante a excreção do vírus na fase

aguda da diarreia, onde apenas 10 partículas se constituem em dose infectante em um trilhão de partículas virais por mililitro de fezes (WARD et al., 1996).

1.8 REPLICAÇÃO E PATOGÊNESE

Os RV-A possuem tropismo pelos interceptos maduros das vilosidades do intestino delgado, especificamente da mucosa do jejuno (LUNDGREN e SVENSSON, 2001). Estas células são infectadas quando as partículas de rotavírus ultrapassam as barreiras de defesa do trato gastrointestinal. A replicação do vírus ocorre principalmente no jejuno, podendo chegar até o íleo. A replicação e a estrutura do vírus são dependentes da concentração de Ca^{2+} no meio. A adsorção dos rotavírus à célula hospedeira é determinada pela proteína VP4, após clivagem em dois domínios VP5* e VP8*, pela ação da tripsina pancreática. O domínio VP5*, ácido-siálico independente, interage na ligação com enterócitos humanos. A penetração da partícula viral na célula é mediada por VP4 e auxiliada pela VP7, processo que envolve receptores contendo ácido siálico e integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 4\beta 1$ e pode ocorrer, diretamente através da membrana plasmática do enterócito ou por endocitose. Nesta etapa ocorre o desnudamento, perda do capsídeo externo e em seguida a liberação do cerne no citoplasma celular.

Os *mRNAs* são sintetizados de forma ordenada, inicialmente pelos segmentos menores e posteriormente pelos maiores. As proteínas codificadas pelo genoma viral são sintetizadas em ribossomos livres, ao contrário das proteínas VP7 e NSP4, que são sintetizadas em ribossomos ligados ao retículo endoplasmático rugoso (RER). A montagem das partículas de duplo capsídeo (*core* viral e VP6) esta associada a

formação de viroplasmas. A maturação final das partículas virais ocorre no interior do RER, na dependência de íons Ca^{2+} . No interior do RER as partículas de dupla camada brotam através da membrana adquirindo a tripla camada. Durante esse processo ocorrem interações específicas entre as proteínas VP4, VP6, VP7 e NSP4, sendo transitoriamente envelopadas. As partículas recebem o capsídeo externo (VP4 e VP7), antes ou após o brotamento a partir do retículo endoplasmático. As partículas virais completas perdem o envelope, migram para o citoplasma e em seguida são liberadas após a lise celular, infectando outros enterócitos (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Estudos envolvendo modelos animais demonstram que durante a replicação dos RVs várias alterações ocorrem como: atrofia das vilosidades; hipertrofia das criptas; dilatação mitocondrial e infiltrado da lâmina própria.

Na célula absorptiva, o retículo endoplasmático se torna dilatado e há destruição das microvilosidades; como consequência, as células das criptas migram rapidamente em direção ao topo das vilosidades, produzindo uma redução na atividade das dissacaridases. Isto causa um aumento da osmolaridade, ocasionando uma afluência de líquidos, dando origem a uma diarreia do tipo osmótica. Esta diarreia ocasiona uma diminuição na digestão de açúcares e na absorção de sais minerais e água, fatores estes que caracterizam a gravidade da doença (KAPIKIAN et al., 2001). Entretanto, estudos em modelo animal demonstraram que a doença diarreica também pode ocorrer na ausência de danos celulares, sugerindo outro fator como causa. Estes estudos indicam que a proteína NSP4 foi a responsável pelas alterações patológicas observadas nas células infectadas (BALL et al., 1996). Atualmente, esta proteína

representa um papel importante na indução da doença diarreica, possuindo atividade semelhante às enterotoxinas bacterianas (RAMIG, 2004). A proteína NSP4 interage com receptor celular do eptélio intestinal expressando aumento nos níveis de Ca^{2+} , o que leva ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática ao cloreto e de sua secreção; como decorrência induz a diarreia secretora (KAPIKIAN et al., 2001).

Estudos recentes descrevem o provável papel do sistema nervoso entérico, quando ativado na presença da proteína NSP4, como indutor da secreção de fluidos intestinais e eletrólitos (LUNDGREN et al., 2000; LUNDGREN e SVENSSON, 2001; RAMIG, 2004).

1.9 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas mais freqüentes observadas nas infecções por RV são diarreia, febre e vômito. A infecção pode ser assintomática ou causar diarreia de variada intensidade, de moderada a grave levando a desidratação e óbito (LINHARES e BREESE, 2000).

A infecção sintomática geralmente ocorre na faixa etária de 6 a 24 meses, porém pode acometer indivíduo de qualquer idade. Recém nascidos e crianças até os 4 meses de idade raramente apresentam a doença sintomática, em função da proteção conferida pelos anticorpos maternos; por outro lado os prematuros podem apresentar quadro grave com alta letalidade (LINHARES et al., 1989). Em adultos e crianças previamente infectados por RV frequentemente apresentam quadro assintomático ou diarreia com sintomatologia mais branda (KAPIKIAN et al., 2001).

O início do quadro clínico é agudo e os vômitos ocorrem na maioria das

infecções por RV. Cerca de 30% a 50% das crianças apresentam febre de ≥ 39 °C precedida do início da diarreia. As fezes são aquosas, isotônicas e raramente contêm muco, sangue ou leucócitos com número aumentado.

Manifestações clínicas não usuais devido a infecção por RV também têm sido descritas, dentre estas, comprometimento das vias respiratórias, evoluindo a otite e broncopneumonia (ZAHN e MARSHALL, 2006), doença de Kawasaki (MATSUNO; UTAGAWA; SUGIURA, 1983), encefalites (BARNES e BISHOP, 1997), enterocolite (MOGILNER e SHANON, 1983), exantema súbito (SAITOH; MATSUNO; MUKOYAMA, 1981) e intussuscepção (NICOLAS et al., 1982).

Em indivíduos saudáveis, as manifestações clínicas perduram no máximo até 8 dias. As re-infecções por RV são comuns, e isto ocorre devido aos diferentes sorotipos do vírus. A primo-infecção é considerada a mais grave e as subsequentes geralmente mais brandas.

1.10 IMUNIDADE

O mecanismo da resposta imunológica contra as infecções por rotavírus ainda não está totalmente definido. Provavelmente a imunidade seja representada por anticorpos sistêmicos, locais - produzidos na mucosa intestinal, ou mediados por células (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

A proteína viral VP6 tem demonstrado o seu potencial imunogênico, na produção de anticorpos secretórios (Imunoglobulinas A - IgA) presentes predominantemente na mucosa do intestino delgado (BURNS et al., 1996).

As proteínas do capsídeo externo da partícula de rotavírus VP4 e VP7 possuem especificidade de sorotipo-específico e são responsáveis pela produção de anticorpos séricos, capazes de neutralizar ação do vírus (OFFIT et al., 1985, 1986; 1993; WARD, 1996). Nas infecções naturais, a proteína VP4 parece ser o principal indutor de imunoglobulinas específicas (WARD, 1996).

A resposta imunológica aos sorotipos de rotavírus possui 2 tipos de componentes: a homotípica, que é sorotipo específica e a heterotípica, ou seja, um sorotipo capaz de induzir a resposta imunológica para mais de um sorotipo, podendo fornecer proteção a outros episódios de diarreia (GERNA et al., 1990; GREEN et al., 1989).

A primo-infecção natural por rotavírus pode conferir proteção contra a forma grave da doença no decorrer de re-infecções subsequentes, sugerindo-se que a imunidade à infecção natural é transitória ou incompleta (BISHOP et al., 1983; VELÁZQUEZ et al., 1996; LINHARES et al., 1989). Na infecção natural sugere-se que a imunidade seja sorotipo-específico e nas demais infecções confira imunidade cruzada. As Imunoglobulinas IgM, IgG, IgA são produzidas tanto na primo-infecção natural como nas infecções subsequentes e são detectadas no soro, saliva e secreções intestinais. Estudos demonstram associação direta dos altos níveis de anticorpos da classe IgA na mucosa intestinal com o nível de proteção contra a infecção por rotavírus e contra a gravidade da doença (BURNS et al., 1996; COULSON et al., 1991).

A imunidade às infecções por rotavírus em neonatos pode ser adquirida passivamente através de anticorpos maternos, administração do leite materno ou

colostro. Esta imunidade não confere proteção total contra a infecção; geralmente a doença é assintomática e parece proteger contra a diarreia grave (MATSUI et al., 1989; ZHENG et al., 1991; NEWBURG et al., 1998).

1.11 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

As manifestações clínicas da infecção ocasionada pelo rotavírus não são específicas e se assemelham às de outros enteropatógenos. Portanto é necessária a confirmação laboratorial, a qual é de grande utilidade para a vigilância epidemiológica e em algumas situações clínicas.

A grande quantidade de vírus excretada durante os primeiros dias da doença (2 - 5 dias) permitiu o desenvolvimento de várias metodologias para a detecção dos rotavírus diretamente das amostras fecais, como a microscopia eletrônica direta (MED) (BISHOP et al., 1973; FLEWETT; BRYDEN; DAVIS, 1973) e técnicas imunológicas como a imunomicroscopia eletrônica (IME) (BRANDT et al., 1981), ensaio imunoenzimático (EIE) (YOLKEN et al., 1978; PEREIRA et al., 1985; DENNEHY; GAUNTLETT; TENTE, 1988), reação de imunofluorescência (YOLKEN et al., 1977; CANDEIAS et al., 1980), radioimunoensaio (KALICA et al., 1977), contraímunoelctroforese (CANDEIAS; ROSENBERG; RÁCZ, 1978), coaglutinação (DURIGON et al., 1991), aglutinação em látex (THOMAS et al., 1994) e imunocromatografia (TOPKAYA et al., 2006). A pesquisa do genoma viral por EGPA além de ser muito utilizada no diagnóstico dos rotavírus, também é aplicada nos estudos epidemiológicos (KALICA et al., 1978; GOUVEA et al., 1990a; LOURENÇO et al., 1981; PEREIRA et al., 1983a,b).

A MED foi a primeira técnica utilizada para a detecção de partículas de rotavírus pelo exame direto em amostras fecais (FLEWETT; BRYDEN; DAVIS, 1973). A IME apresenta maior especificidade e sensibilidade comparada à MED, pois esta técnica utiliza anticorpos específicos para rotavírus (WU et al., 1990). A MED e IME são ferramentas importantes no diagnóstico dos rotavírus e outros vírus associados à doença diarréica, porém seu uso rotineiro se torna inviável devido à necessidade de técnicos altamente especializados e ao custo elevado do aparelho (DENNEHY et al., 1988).

O EIE é o método imunológico mais utilizado no diagnóstico das gastroenterites por rotavírus, permitindo a detecção direta do antígeno nas fezes. Os vários ensaios disponíveis comercialmente para o diagnóstico dos RV do grupo A, utilizam anticorpos monoclonais ou policlonais direcionados à proteína VP6, proteína do capsídeo interno a qual define antígeno comum de grupo. É um método amplamente utilizado apresentando alta sensibilidade e especificidade, considerado de fácil execução, acessível a laboratórios de rotina e que permite testar inúmeras amostras simultaneamente. Seu emprego em laboratórios clínicos tornou-se viável devido a produção de reagentes específicos em grande escala (YOLKEN et al., 1978; PEREIRA et al., 1985; DENNEHY et al., 1988).

Ensaio imunoenzimático, utilizando anticorpos monoclonais específicos, também são empregados para a detecção dos rotavírus dos grupos B e C (FUJII et al., 1992), porém estes de uso apenas em Instituições de pesquisa. A reação de polimerase em cadeia (*PCR*) tem sido utilizada para a detecção dos rotavírus dos grupos B e C (GOUVEA et al., 1991).

Os métodos de aglutinação em látex e imunocromatografia para detecção dos RVs-A apresentam sensibilidade pouco inferior quando comparado ao EIE, porém devido a rapidez do teste e fácil execução tem sido amplamente utilizado e recomendado em hospitais e em consultórios pediátrico (WILHELMI et al., 2001; THOMAS et al., 1994).

A EGPA é uma técnica amplamente utilizada para a pesquisa do genoma dos rotavírus, no âmbito da investigação científica. O dsRNA dos rotavírus apresenta 11 segmentos com diferentes perfis eletroforéticos. Esses perfis são determinados com base na velocidade de migração dos segmentos genômicos “10” e “11”, sendo classificados como “curtos”, “longos” e “supercurtos” (TANIGUCHI e URASAWA, 1995). Empregando a EGPA, vários estudos demonstraram a diversidade de perfis eletroforéticos encontrados em amostras de rotavírus (GOUVEA et al., 1990a; LOURENÇO et al., 1981; PEREIRA et al., 1983 a,b; STEWIEN et al., 1994). A análise dos perfis eletroforéticos do genoma dos rotavírus apresenta importante significado epidemiológico, permitindo demonstrar a presença da diversidade de eletroferotipos, de diferentes cepas de rotavírus em diferentes regiões em que circulam e a época do ano, a possibilidade de definir surto de diarreia, modo de transmissão e acompanhar a sua evolução (ESTES et al., 1984; GOUVEA et al., 1990a). Esta técnica também tem sido utilizada para o diagnóstico presuntivo dos rotavírus do grupo não-A, apresentando perfis eletroforéticos distintos. Estes vírus não possuem a trinca de segmentos 7, 8 e 9 na Classe III, que é característica do rotavírus do grupo A (4:2:3:2). Os rotavírus dos grupos B, E e G apresentam o seguinte perfil eletroforético 4:2:2:3, do grupo C, 4:3:2:2 e dos grupos D e F, 5:2:2:2 (LOURENÇO et al., 1981; SAIF e JIANG, 1994).

Para estudos epidemiológicos e investigação científica, a determinação dos RVs-A em sorotipos e subgrupos é realizada por ensaios imunoenzimáticos, com anticorpos monoclonais; e por metodologias moleculares como Transcrição Reversa – Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR), para detecção e caracterização dos genótipos.

Recentemente, outras metodologias como RT-PCR ELISA e *Microarray* hibridização foram desenvolvidas com o objetivo de diminuir a frequência de amostras de RVs não tipadas por EIE ou RT-PCR. Ambas as técnicas empregam diversas sondas específicas para os tipos G (VP7) e P (VP4) demonstrando ser altamente sensíveis e específicas (SANTOS et al., 2008; HONMA et al., 2007).

Os RVs podem ser isolados em cultura de células com utilização de linhagens de origem animal e humana como MA104 (rim de macaco rhesus) e CaCo-2 (adenocarcinoma de cólon humano). Entretanto, a propagação do vírus é muito lenta, desta maneira o método não possui valor prático para o diagnóstico e seu uso limita-se a investigação científica.

1.12 EPIDEMIOLOGIA

1.12.1 Distribuição rotavírus

Após a descrição inicial da presença de rotavírus em humanos (BISHOP et al., 1973; FLEWETT; BRYDEN; DAVIS, 1973), vários estudos epidemiológicos têm sido descritos no mundo, demonstrando o impacto da doença diarréica por este vírus (PARASHAR et al., 2006).

Aproximadamente 110 milhões de casos de diarréia a cada ano são atribuídos aos RVs. Estima-se que causa > 500.000 mortes por ano em crianças menores de 5

anos de idade e é responsável por 2 milhões de hospitalizações em todo o mundo, com consequente impacto econômico. Nos países em desenvolvimento, aproximadamente 1.200 crianças morrem diariamente devido à doença, sendo que 82% destas mortes são oriundas de países mais pobres (ESTES e KAPIKIAN, 2007; PARASHAR et al., 2006; GLASS et al., 2006).

Nos Estados Unidos, a doença por RV acomete aproximadamente 3 milhões de crianças menores de cinco anos de idade, e destas, 55 a 70 mil são hospitalizadas, com estimativa de 200 milhões de dólares em gastos hospitalares e aproximadamente 1 bilhão de dólares em gastos sociais (WIDDOWSON et al., 2007; PARASHAR et al., 2006). Na América Latina, África e Ásia, estima-se a ocorrência de 30% a 60% das hospitalizações em crianças menores de 5 anos de idade devido a infecção por RV, e destas aproximadamente 80% das mortes ocorrem na África e Ásia (O'RYAN et al., 2001; STEELE et al., 2003; BRESEE et al., 2004; RHEINGANS et al., 2007).

No Brasil, após três décadas do primeiro relato da ocorrência de rotavírus em casos de diarreia aguda, diversos estudos epidemiológicos e moleculares têm sido realizados. A maioria destes estudos permitiu determinar o impacto da doença ocasionado pelo rotavírus, bem como conhecer a diversidade de genótipos circulantes no nosso meio (LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES, 2008; SARTORI et al., 2008; LINHARES, 2000; LINHARES et al., 1977). A gravidade da doença diarreica causada por RV tem sido maior no âmbito ambulatorial e hospitalar, quando comparado no comunitário (KAPIKIAN et al., 2001). Aproximadamente 12% a 48% dos rotavírus têm sido associados a casos que necessitam de hospitalização ou atendimento ambulatorial, afetando principalmente crianças abaixo de 2 anos de idade (ANDREASI

et al., 2007; CARVALHO-COSTA et al., 2006; CARNEIRO et al., 2005; LUZ et al., 2005; CARMONA et al., 2004; LINHARES et al., 2000; STEWIEN et al., 1994; PEREIRA et al., 1993).

Infecções assintomáticas por rotavírus têm sido relatadas, porém com pouca frequência. A excreção assintomática desses vírus parece estar mais associada a adultos e crianças maiores de dois anos de idade, que permanecem em comunidades fechadas como creches e hospitais, funcionando como possíveis reservatórios da infecção (TIMENETSKY et al., 1993; LINHARES et al., 1989; KOOPMAN; MONTO; LONGINI, 1989; PICKERING et al., 1988).

Infecção primária assintomática ou clinicamente leve já foi descrita em neonatos, isto provavelmente ocorra devido a transferência passiva de anticorpos maternos. Estas cepas de rotavírus detectadas entre neonatos foram consideradas naturalmente atenuadas, representando possíveis candidatas a vacina contra a doença (CICIRELLO et al., 1994; BHAN et al., 1993; LINHARES et al., 1989).

Linhares et al. (2002) realizaram o primeiro estudo no Brasil demonstrando participação dos rotavírus entre neonatos hospitalizados ocasionando infecções, das quais a maioria desenvolveu infecção nosocomial assintomática.

O rotavírus também apresenta papel importante nas infecções nosocomiais infantil, relatado em inúmeros estudos (GUTIÉRREZ-GIMENO et al., 2010; GLEIZES et al., 2006; CHANDRAN et al., 2006; FISCHER; BRESEE; GLASS, 2004; WIDDOWSON et al., 2000; GAGGERO et al., 1992).

Gusmão et al. (1995) demonstraram a participação dos rotavírus como causa de diarreia nosocomial em crianças internadas em um Hospital Público de Belém, Pará. Os

autores verificaram que, em 40% dos casos, os rotavírus estiveram associados às diarreias adquiridas em ambiente hospitalar.

Da mesma maneira, Moreira et al. (2009) em Salvador, Bahia, avaliaram a participação dos rotavírus em 77 casos de gastroenterites nosocomial identificados, do qual 76,6% dos casos foram positivos.

Geralmente, nos 2 primeiros anos de vida, as crianças já desenvolvem infecções primárias ou secundárias por rotavírus. Portanto, cerca de 80% a 90% das crianças adquirem anticorpos contra os rotavírus até os 3 anos de idade (COX et al., 1998; ISHAK et al., 1984; LINHARES et al., 1983).

Nos adultos, a infecção pelo rotavírus tem sido relatada em surtos epidêmicos e em forma esporádica, algum destes casos ocorrendo de maneira grave (TATTE; GENTSCH; CHITAMBAR, 2010; PODKOLZIN et al., 2009; FEENEY et al., 2006; ANDERSON e WEBER, 2004; RUBILAR-ABREU et al., 2005; WANG et al., 2007; TIMENETSKY et al., 1996).

A variação sazonal dos rotavírus nas infecções diarreicas é bem estabelecida em países de clima temperado, sendo freqüentes durante os meses mais frios. Nos países de clima tropical, porém sua distribuição é relativamente constante durante o decorrer do ano (LINHARES, 2000; BISHOP et al., 1996; COOK et al., 1990; LINHARES et al., 1989).

No Brasil, Pereira et al. (1993) observaram dois panoramas distintos de sazonalidade durante estudo envolvendo estados de diversas regiões do Brasil. A ocorrência da infecção por rotavírus apresentou maior incidência nos meses mais frios e secos, em algumas áreas das regiões sul, sudeste e central do País. Entretanto, nas

demais regiões a ocorrência dos rotavírus foi constante ao longo de todo o ano.

1.12.2 Sorotipos/Genótipos

Atualmente, a distribuição endêmica dos rotavírus e a epidemiologia dos diferentes sorotipos/genótipos circulantes estão bem definidas em diversas regiões do mundo.

Até o momento foram descritos em humanos 11 sorotipos/genótipos G de rotavírus (G1-G6 e G8-G12) e 12 P (P1 [8], P1B [4], P2A [6], P2C [6], P3 [9], P4 [10], P5A [3], P6 [1], P8 [11], P11 [14], P12 [19] e P [25]) (MATTHIJNSSENS et al., 2008a).

Os sorotipos/genótipos G1, G2, G3, G4 e P[8] estão freqüentemente associados à diarreia em humanos, apresentando maior importância epidemiológica, e é com eles que as vacinas foram desenvolvidas (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

No Brasil, a primeira caracterização dos rotavírus em sorotipos foi realizada por Linhares et al. (1988). Os autores utilizando de ensaios imunoenzimáticos com anticorpos monoclonais específicos demonstraram que, entre as amostras de rotavírus caracterizadas, 50%, 40%, 3,3% e 16,7% pertenciam aos sorotipos G1, G2, G3 e G4, respectivamente. Stewien et al. (1994) demonstraram na cidade de São Luís, Maranhão, que os sorotipos de rotavírus G3, G1 e G4, mais comumente relacionados às infecções foram encontrados em 41%, 27% e 9%, respectivamente. O sorotipo G2 não foi detectado nas amostras analisadas. Castro et al. (1994) identificaram o sorotipo G1 como causa de um surto ocorrido em uma creche no Rio de Janeiro. Os autores também observaram que no período de 1989 a 1991, antes da ocorrência do surto, somente o sorotipo G2 havia sido identificado nessa mesma creche. Timenetsky et al.

(1996) descreveram um surto de gastroenterite grave ocorrido no Interior do Estado de São Paulo afetando adultos e crianças. O rotavírus foi detectado em 44% das amostras analisadas e, identificado o genótipo G2 como causa do surto.

Tipos de rotavírus considerados não usuais em amostras humanas têm sido descritos em diversos países, incluindo o Brasil (LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES, 2008; SANTOS e HOSHINO, 2005; GENTSCH et al., 2005; CASTELLO et al., 2004).

Os genótipos G5 (GOUVEA et al., 1994a; CARMONA et al., 2004; LEITE et al., 1996), G6 (MARTINI et al., 2008), G8; G10 (GÓMEZ et al., 2010; VOLATÃO et al., 2006; MASCARENHAS et al., 2002; SANTOS et al., 1998) e G12 (PIETRUCHINSKI et al., 2006) já foram detectados em diversas regiões do Brasil.

O genótipo G5 também foi detectado na Argentina, Paraguai, Republica dos Camarões, do Reino Unido China e Vietnan (SANTOS e HOSHINO, 2005; DUAN et al., 2007; AHMED; ANH; NAKAGOMI, 2007); G6 tem sido detectado na Austrália, Índia, Estados Unidos, Bélgica, e Hungria; G8 tem sido frequentemente detectado na África e esporadicamente em na Ásia e América do Sul; G10 em sido relatado no Reino Unido, Índia, Tailândia e Paraguai (SANTOS e HOSHINO, 2005); G11 foi recentemente detectado em Daca, Bangladesh (RAHMAN et al., 2005b) e Coréia do Sul (HONG et al., 2007); e G12 foi detectado na América do Norte, América do Sul, Ásia e Europa (CASTELLO et al., 2006, 2009; PIETSCH e LIEBERT, 2009; HOSHINO e KAPIKIAN, 2005; CASTELLO et al., 2004).

O genótipo G9 inicialmente considerado um tipo não usual, tem sido identificado com muita freqüência em diversos países, sendo atualmente considerado como o

quinto tipo de rotavírus mais freqüente mundialmente (SANTOS & HOSHINO, 2005; GENTSCH et al., 2005; CASTELLO et al., 2004). No Brasil, este sorotipo foi encontrado pela primeira vez em Belém do Pará (1990-1992), a seguir amplamente detectado em diversos Estados do país (MUNFORD et al., 2009; CARMONA et al., 2006; SANTOS et al., 2005; SOUZA et al., 2003; ARAUJO et al., 2001; SANTOS et al., 2001; LINHARES et al., 1996).

Inúmeros estudos realizados sobre a distribuição dos genótipos P e G de rotavírus demonstram que as associações consideradas usuais P[8]G1, [4]G2, P[8]G3 e P[8]G4 são as mais freqüentes nas infecções em humanos. Representando 90% das infecções na América do Norte, Europa e Austrália. Na América do Sul e Ásia estas associações representam 68% das infecções, América Latina cerca de 80% e na África 50%.(GENTSCH et al., 2005; SANTOS e HOSHINO, 2005; CASTELLO et al., 2004).

No Brasil, estudos realizados sobre a distribuição dos genótipos de RV-A indicam a predominância de 62% de amostras humanas caracterizadas como P[8]G1/P[Não tipadas (NT)]G1; P[4]G2/P[NT]G2; P[8]G3/P[NT]G3 e P[8]G4/P[NT]G4 (Figura 5).

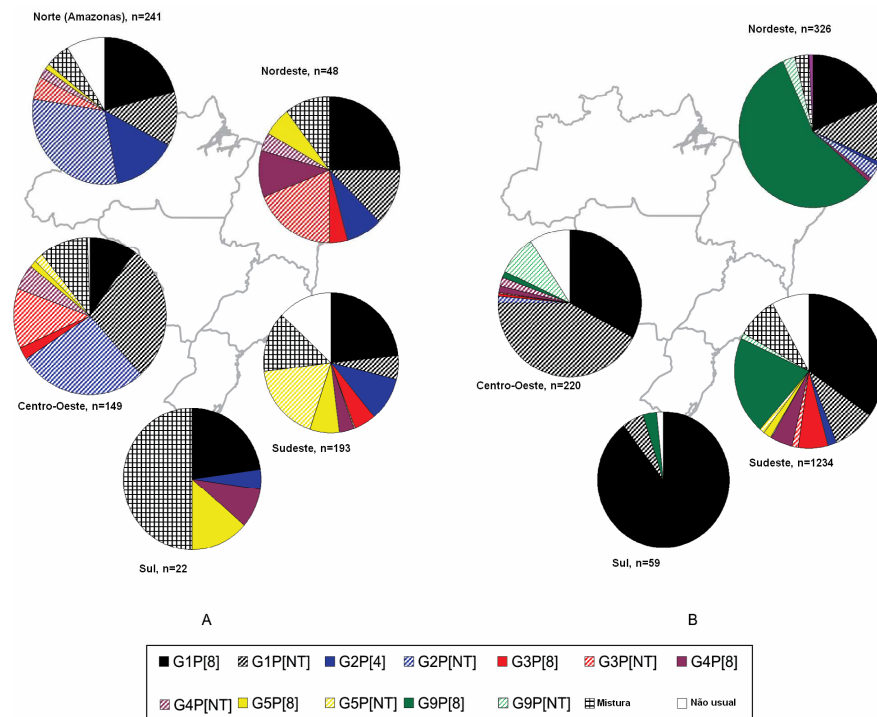


Figura 5. Distribuição dos genótipos de rotavírus no Brasil por região geográfica.
 FONTE: Adaptado de Leite; Carvalho-Costa; Linhares. (2008).

O primeiro estudo de vigilância da associação dos genótipos P e G de rotavírus em casos de gastroenterites agudas foi realizado no Brasil por Timenetsky, Santos; Gouvea (1994). Utilizando a técnica de *PCR*, os autores analisaram 139 amostras de rotavírus isoladas de crianças com gastroenterite aguda no Estado de São Paulo e observaram predominância dos genótipos P[8] (21%) e P[4] (8%). Estes estiveram em associação com os sorotipos G1, G3, G4 e G2, respectivamente. Também foi observada a presença de número grande de amostras P[6], P[3], mistura de genótipos G e P e uma diversidade de genótipos ainda não encontrados em humanos.

Associações de rotavírus P e G não usuais também têm sido detectadas em todo mundo, representando aproximadamente 5% do total das amostras de RV, destes a

maioria é detectada nos países da África, América do Sul e Ásia (LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES, 2008; GENTSCH et al., 2005; SANTOS e HOSHINO, 2005).

Diversas associações de rotavírus P e G, até então descritas, demonstram a possibilidade da ocorrência de *reassortment* de forma espontânea na natureza entre amostras de diferentes genótipos de RV humanos (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001). Por outro lado, associações consideradas não usuais, também poderiam representar *reassortants* entre amostras de RV de origem humana com animal (DAS et al, 1994); ou até mesmo pela transmissão direta de RV animal para humano, esta última possibilidade classificaria os rotavírus como uma zoonose (BÁNYAI et al., 2009; COOK et al., 2004; PALOMBO, 2002; DUNN, et al., 1993).

As associações P e G não usuais poderiam emergir como resultado de infecções mistas de RV (GOUVEA e BRANTLY, 1995). As infecções mistas por rotavírus têm sido detectadas na América do Sul, Ásia, África, América do Norte, Austrália e Europa, com frequência aproximada de 15%, 12%, 10%, 5%, 2% e 1,8%, respectivamente (SANTOS e HOSHINO, 2005). Nos países em desenvolvimento, a diversidade de tipos incomuns de RV é freqüentemente encontrada, portanto a detecção de infecções mistas é muito elevada (GENTSCH et al., 2005). O impacto destas amostras não usuais na evolução dos RVs ainda não foi determinada, entretanto sabe-se que poderia proporcionar a introdução de um novo tipo P ou G de RV na população humana através do evento de *reassortment* (MAUNULA e VON BONSDORFF, 2002).

1.13 TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLE

O tratamento das doenças diarréicas agudas por rotavírus e outros enteropatógenos associados consiste na reposição das perdas hidroeletrólíticas. Esforços contínuos têm sido realizados mundialmente para incentivar o uso da TRO nos casos de diarréia aguda moderada e grave. Para esta finalidade, a Organização Mundial da Saúde padronizou os componentes utilizados na solução de reidratação oral (WALKER et al., 2009).

Diversos estudos controlados e metanálises têm demonstrado a utilização de probióticos na redução do tempo da diarréia aguda por RV bem como a sua gravidade. Os efeitos do uso de probióticos também têm sido avaliados em ensaios controlados randomizados para a prevenção da infecção por RV nosocomial ou adquirida na comunidade, em lactentes e crianças jovens (SZAJEWSKA e DZIECHCIARZ, 2010; GUANDALINI et al., 2008; MRUKOWICZ; SZAJEWSKA; VESIKARI, 2008).

Um medicamento recentemente lançado no mercado, denominado nitazoxanida, já esta em utilização para tratamento das diarréias causadas por parasitas e da mesma maneira tem sido indicada para tratamento de rotavírus e norovírus. De acordo com os estudos realizados, o medicamento mostrou ser efetivo na redução do tempo de duração da doença, possuindo atividade anti-viral decorrente de um mecanismo de provável atuação na síntese da proteína viral, inibindo a replicação viral, e podendo reduzir a excreção do vírus. Porém, estudos adicionais são necessários para confirmar a segurança da nitazoxanida e eficácia no tratamento da diarréia por rotavírus (TERAN; TERAN-ESCALERA; VILLARROEL, 2009; ROSSIGNOL; KORBA; KABIL, 2006; LANATA e FRANCO, 2006).

A utilização de imunoglobulinas de origem animal ou humana, com níveis

elevados de anticorpos da classe IgA para RV, adquiridos por imunização, tem demonstrado eficácia contra a gravidade da doença diarreica em crianças imunodeficientes (MRUKOWICZ; SZAJEWSKA; VESIKARI, 2008).

Devido à importância epidemiológica dos rotavírus nas gastroenterites graves, que levam a óbito > de 400 mil crianças menores de 5 anos de idade no mundo inteiro, inúmeros esforços têm sido realizados na elaboração de uma vacina eficaz para o combate efetivo da doença (DENNEHY, 2008).

A primeira vacina de rotavírus foi produzida seguindo os princípios de Edward Jenner, que imunizou com sucesso seres humanos contra a varíola no século XVII, utilizando vírus vivo de origem bovina.

Três vacinas monovalentes, vivas atenuadas de origem animal seguindo o princípio de Jenner foram desenvolvidas. São elas: RIT-4237; WC3 e MU18006. A primeira vacina monovalente testada contra rotavírus era constituída por vírus de origem bovina, denominada RIT-4237. Esta cepa foi derivada de rotavírus de origem bovina (NCDV - "Nebraska Calf Diarrhoea Virus", sorotipo P[1]G6), considerada uma cepa naturalmente atenuada para humanos. Esta vacina proporcionou uma eficiência de 88% na proteção contra a doença em crianças finlandesas de 6 a 12 meses de idade (VESIKARI et al., 1984). Nos países em desenvolvimento, como Peru e Gâmbia, a eficácia desta vacina foi testada, apresentando reduzida imunogenicidade em crianças menores de 6 meses de idade e, em consequência, o seu uso foi interrompido (VESIKARI e JOENSUU, 1996). Outra vacina de origem bovina, WC3 (sorotipo P[5]G6), mostrou ser eficaz na proteção homotípica contra a doença diarreica moderada e grave em crianças de 5 a 11 meses de idade (CLARK et al., 1988). Porém, em outros

estudos, a vacina mostrou eficiência reduzida (MIDTHUN e KAPIKIAN, 1996). A vacina MMU 18006 (RVV, sorotipo P[3]G3), originária de rotavírus símia, mostrou ser segura e imunogênica em crianças de 2 a 5 meses de idade. Porém, 3 a 4 dias após a vacinação, 30% destas crianças desenvolveram reações adversas. Esta vacina desenvolveu proteção contra a cepa homotípica de rotavírus (sorotipo G3) e não proteção heterotípica. Durante o período de estudo circulava o sorotipo G1 na comunidade. Estes estudos demonstraram resultados variáveis, e por esta razão, constatou-se a necessidade da elaboração de uma vacina que protegesse contra os quatro sorotipos de RV considerados mais importantes epidemiologicamente para o homem.

A partir daí foram desenvolvidas vacinas derivadas de rearranjos genéticos (*reassortants*) entre amostras de rotavírus animais e humanas.

Como os rotavírus animais são cultiváveis em linhagens contínuas celulares e apresentam baixo potencial patogênico, foi feito rearranjo genético (*reassortants*) *in vitro* entre cepas de rotavírus origem símia (RRV), sorotipo G3 e de origem humanas (HRV): D (sorotipo G1) X RRV, DS-1 (sorotipo G2) X RRV, e ST3 (sorotipo G4) X RRV. Todos os segmentos são derivados da cepa símia RRV, menos o segmento 9 que codifica a proteína VP7 derivada das amostras de rotavírus humanas. A vacina RRV-TV contém a amostra símia RRV, sorotipo G3, e os *reassortants* para os sorotipos G1, G2 e G4 (HOSHINO e KAPIKIAN, 1994b; KAPIKIAN et al., 1996) (Figura 6).

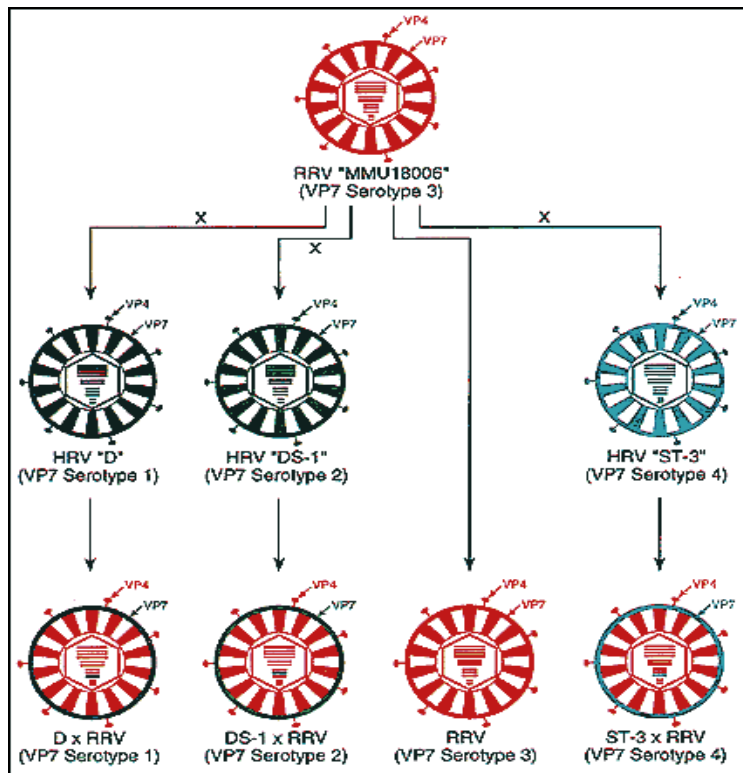


Figura 6. Demonstração esquemática do *reassortant* entre amostras de RV animal e humana na produção da vacina tetravalente humana com VP7 sorotipos específicos.
 FONTE: Kapikian et al. (1996)

Durante estudos clínicos com a vacina RRV-TV (*rhesus-human reassortant rotavirus tetravalent vaccine*), realizados em crianças nos EUA, Venezuela e Finlândia observou-se eficácia de 69%, 88% e 91%, respectivamente, nos casos mais graves da doença diarréica por RVs. No Brasil, Linhares et al. (1996) observaram eficácia contra a doença diarréica de 35%, e 57% de imunogenicidade durante o primeiro ano de acompanhamento.

Em agosto de 1998, o órgão governamental dos Estados Unidos, *Food and Drug Administration* (FDA) licenciou a vacina tetravalente contra rotavírus - RRV-TV, conhecida como *Rotashield™* (Wyeth-Laboratories, Inc., Marietta, Pensilvânia, EUA).

Em julho de 1999, depois de ter sido administrada cerca de um milhão e meio de doses nos EUA, a vacina foi suspensa e retirada do mercado devido à associação com casos de intussuscepção em 15 crianças vacinadas (CDC, 1999a,b). Em outubro do mesmo ano, o Comitê Assessor para Prática de Imunizações (ACIP) cancelou a recomendação do uso da *Rotashield*TM em território americano, recomendando mais estudos na associação de casos de intussuscepção como reação adversa à vacina. Tal medida também foi sugerida a outras regiões do mundo (MURPHY et al., 2001).

Atualmente, algumas vacinas já foram licenciadas para uso em humanos e outras estão na fase de ensaios clínicos. Estas vacinas foram desenvolvidas utilizando amostras de vírus vivos atenuados de origem humana (LLR e RIX4414/Rotarix®), amostras de rotavírus recombinantes de bovino-humano (WC3/Rotateq e UK) e amostras de origem neonatal (116E, RV3, I32, M37).

A vacina contra RV LLR é composta por amostra de vírus atenuada de origem ovina, sorotipo P[12]G10 (Lanzhou Institute of biological Products, China). Esta vacina foi licenciada apenas para uso em algumas regiões da China (GLASS et al., 2005).

Em 2004, a vacina contra rotavírus Rotarix® (GlaxoSmithKline® Biologicals, GSK, Rixensart, Bélgica) foi aprovada no mercado Internacional. Trata-se de uma vacina oral, atenuada, monovalente (P[8]G1-II), amostra RIX4414. Originalmente, esta amostra de RV foi isolada a partir de fezes de uma criança com quadro de diarreia moderada, em Cincinnati, Ohio, EUA, designada de 89-12. A partir de passagens seriadas em cultura de células VERO (rim de macaco verde africano) e posteriormente clonagem deu origem a amostra atenuada RIX4414 (BERNSTEIN et al., 2002). Ensaios

clínicos desenvolvidos com a vacina em lactentes de 6 a 13 semanas de idade provenientes de 11 países da América Latina (Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Honduras, México, Nicarágua, República Dominicana, Panamá, Peru, Venezuela) e Finlândia, demonstraram aproximadamente 85% de eficácia contra a doença diarreica grave. A eficácia para prevenção de diarreia grave para os sorotipos de RV foi de 90,8% para P[8]G1; 87,3% para P[8]G3, P[8]G4P[8] e P[8]G9 e 41,0% para P[4]G2. A proteção teve início cerca de duas semanas após a segunda dose. Não foram observados casos com reações adversas graves, como intussuscepção (RUIZ-PALACIOS et al., 2006). Em março de 2006, o Brasil foi o primeiro país do mundo a introduzir a vacina oral contra rotavírus humano (VORH) Rotarix® no sistema público de saúde, Programa de Imunização Nacional.

A vacina oral atenuada pentavalente contra RV Rotateq® (Merck Sharp & Dohme) é derivada da amostra bovina WC3. É produzida com reassortant entre a cepa bovina e humana, para os tipos G1, G2, G3, G4 e P[8]. Trata-se de produto não-reatogênico e altamente eficaz, alcançando níveis protetores de até 100% frente aos episódios diarreicos mais graves. Recentemente a vacina foi licenciada pelo FDA nos EUA. Além da ausência quanto ao risco representado pela intussuscepção, a vacina apresentou 98% de eficácia referente aos episódios graves causados por rotavírus (VESIKARI et al., 2006). Em abril de 2008 esta vacina foi licenciada no Brasil pela Agência Nacional Vigilância Sanitária (ANVISA).

Outra candidata à vacina oral contra rotavírus foi produzida pelo National Institute of Health (NIH), a partir de *reassortants* entre amostras bovinas UK e humanas,

utilizando os sorotipos G1 a G4, e tipos adicionais como G8 ou G9, conforme sua importância epidemiológica no país. Estudos de fase II realizados na Finlândia têm se mostrado satisfatórios quanto aos níveis de inocuidade, eficácia e imunogenicidade (KAPIKIAN et al., 2005). Atualmente, a vacina está em fase de produção em escala para os ensaios clínicos no Brasil, China e Índia. No Brasil, a Fundação Butantan, em São Paulo, tem realizado a produção da vacina pentavalente com foco nos sorotipos mais frequentes no país (G1 a G4), incluindo o sorotipo G9, pois este tem sido detectado com alta frequência nas duas últimas décadas no nosso meio (LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES, 2008; CARMONA et al., 2006). Além da vantagem de fornecer um produto mais específico para a realidade nacional, a meta é reduzir os custos da vacina e fornecer um preço mais acessível para o governo brasileiro.

Candidatas monovalentes a vacinas contra rotavírus compostas de amostras de neonatos humanos têm sido avaliadas quanto a sua eficácia e potencial imunogênico, como a cepa proveniente da Austrália, RV3 (sorotipo G3); e amostras de RV oriundas da Índia, 116E (sorotipo G10) e I32I (sorotipo G9) (BHANDARI et al., 2006; BARNES et al., 2002). A cepa M37, P [6]G1 foi a primeira candidata a vacina utilizando esta estratégia, isolada em neonatos com infecção assintomática na Venezuela e considerada uma cepa naturalmente atenuada. Entretanto, os resultados inexpressivos de eficácia obtidos em testes realizados na Finlândia promoveram a descontinuação dos estudos com esta vacina (LINHARES e BRESEE, 2000).

A vacina RRV-TV *Rotashield* foi adquirida pelo grupo americano BioVirx, que possui planos para retomar a sua fabricação. Este grupo considera que o risco de intussuscepção dos estudos originais foi seriamente superestimado e que, dada a

elevada mortalidade e morbidade infantil devido a doença diarréica por rotavírus nos países em desenvolvimento, o benefício seria maior em relação a possibilidade de eventuais riscos (GLASS et al., 2005).

No quadro 5 encontra-se um resumo das vacinas atualmente licenciadas e em desenvolvimento.

Quadro 5 - Vacinas orais contra rotavírus atualmente licenciadas e em desenvolvimento.

Vacina/Origem/Laboratório, País	Cepas rotavírus/genótipo	Estágio
1. Tetravalente, <i>reassortant</i> entre amostras de rotavírus rhesus (RRV) - humana/BIOVIRX, EUA	RRV X D/P[3],G1 RRV X DS1/P[3], G2 RRV/P[3], G3 RRV X ST3/P[3],G4	Licenciada 1998 (EUA) Suspensa em 1999 Atualmente não comercializada
2. Monovalente, amostra de rotavírus atenuada humana (RIX4414)/ GSK, Bélgica	89-12/P[8]G1	Licenciada
3. Pentavalente, <i>reassortant</i> entre amostras de rotavírus bovina (WC3)- humana/Merck, EUA	WC3 X 179/P[5],G1 WC3 X SC2/ P[5],G2 WC3 XW178/P[5],G3 WC3 XBrB/P[5],G4 WC3 XW179/P[8],G1	Licenciada
4. Monovalente, amostra ovina/Lanzhou Institute of Biological Products, China	LLR/P[12],G10	Licenciada na China
5. Tetravalente rearranjo de amostras de rotavírus de bovina (UK)-humana/National Institute of Health, EUA	UK X Wa/P[5],G1 UK X DS1/P[5],G2 UK X P[5],G3 UK X ST3/P[5]G1	Fase II
6. Monovalente, neonatal humana (RV3)/Universidade de Melbourne, Austrália e Bio Farma, Indonésia.	RV3/P[6], G3	Fase II
7. Monovalente, neonatal humana/Bharat Biotech, Índia.	116E/P[11], G10	Fase I

Além dos sorotipos reconhecidos como de importância epidemiológica universal (P[8] G1, G2, G3 e G4), o encontro de tipos adicionais deve ser considerado para o desenvolvimento de novas vacinas a serem administradas em diferentes regiões do mundo. Desta maneira, a vigilância contínua dos rotavírus é imprescindível para monitorar a diversidade genética e antigênica de cepas circulantes na nossa comunidade, antes e após a introdução de uma vacina contra a doença (KAPIKIAN e HOSHINO, 2007). Este monitoramento permite prever possíveis emergências e/ou re-emergências de genótipos e aperfeiçoar a compreensão da dinâmica e o padrão de evolução do vírus.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos

- a) Verificar a frequência da presença de RVs-A em fezes de pacientes com quadro de diarreia aguda no Estado de São Paulo, no período de 1996 a 2006.
- b) Caracterizar as amostras positivas para RVs-A em genótipos G(VP7) e P (VP4).
- c) Determinar a temporalidade dos genótipos G(VP7) e P(VP4) encontrados ao longo do estudo.
- d) Identificar surtos de diarreia causados por RVs e verificar a sua associação com genótipos P(VP4) e G(VP7) caracterizados.
- e) Realizar a análise filogenética das sequências parciais do gene 9 (VP7) dos RVs mais frequentes no estudo.
- f) Comparar as sequências de aminoácidos dessas amostras com vírus padrão de referência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Amostras clínicas (fezes)

Durante programa de Monitorização da Doença Diarréica Aguda (MDDA) conduzido no Estado de São Paulo entre 1996 e 2006 foram selecionadas 1.300 amostras de RVs-A humanos detectados no período. Estas amostras de RVs foram selecionadas de 1.784 RVs positivos, de 8.961 fezes coletadas de pacientes com quadro de diarréia aguda que procuraram atendimento médico nas diversas unidades de Serviço Público de Saúde e encaminhadas ao Núcleo de Doenças Entéricas, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz para análise laboratorial. Os pacientes eram constituídos por crianças menores de 5 anos de idade (< 2 meses, 3 a 6 meses, 7 a 12 meses, 13 a 24 meses e 25 a 60 meses), crianças jovens (>5 - 17 anos), adultos (18 - 59 anos) e idosos (\geq 60 anos). Estes casos individuais de doença diarréica aguda, em geral, não são de notificação compulsória. No Estado de São Paulo, notificam-se casos de diarréia aguda atendidos pelas unidades sentinela em municípios participantes do programa de MDDA, ou quando constituem forte suspeita de surtos/epidemia.

As amostras analisadas são provenientes de uma amostragem retrospectiva de conveniência, não probabilística, não apresentando critérios de inclusão, exclusão e sem informações epidemiológicas completas dos indivíduos participantes. Desta maneira, o estudo não pode projetado para a realidade populacional.

3.1.2 Amostras de rotavírus

As 1.784 amostras de RVs foram identificadas previamente utilizando ensaio imunoenzimático e eventualmente eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparo das suspensões de fezes

As amostras de fezes foram suspensas a 10% em tampão TRIS/HCl 0,1M pH 7,4, homogeneizadas e clarificadas por centrifugação a 2000x g por 15 minutos, a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e estocados a -20 °C até o momento de serem processados.

3.2.2 Ensaio imunoenzimático para a detecção de RVs-A

As amostras de RVs selecionadas foram identificadas utilizando o ensaio imunoenzimático comercial ELISA - *Premier Rotaclone*[®], Meridian Diagnostics, Cincinnati, OH, USA, com anticorpo monoclonal específico para detecção de antígeno do RVs – A, e realizado conforme instruções do fabricante. Foram adicionados 100 µL da suspensão de fezes a 10% e 100 µL dos controles positivo (SA-11) e negativo (diluyente da amostra) nos orifícios correspondentes da microplaca. Em seguida foram adicionados 100 µL do conjugado (anticorpo de coelho anti-rotavirus conjugado com peroxidase) e incubados a temperatura ambiente (18 a 25 °C) por 1 hora. Os orifícios da microplaca foram lavados 4 vezes consecutivos com 300 µL de água Milli Q estéril. Em seguida foram adicionados 100µL do substrato (peróxido-uréia e TMB) e incubados

por 10 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com adição de 50 µL da solução bloqueadora - H₂SO₄ 1N e em seguida realizada a leitura de densidade ótica em aparelho leitor de microplaca com filtro de 450 nm de absorbância.

3.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A pesquisa de RVs nas amostras fecais foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida, segundo técnica descrita por Pereira et al. (1983a).

3.2.3.1 Extração do ácido nucléico dos rotavírus

Foram transferidas 400 µL de cada suspensão fecal para microtubos com capacidade para 1,5 mL, contendo 40 µL da solução duodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e incubadas a 37 °C durante 30 minutos. A seguir, foram adicionados 200 µL em cada microtubo, uma mistura de partes iguais de clorofórmio-fenol. Essa mistura permaneceu à temperatura ambiente por 15 minutos, com agitação constante. Em seguida, a mistura foi centrifugada à 5000x g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para outros microtubos, contendo previamente 400 µL de NaCl a 20% e 1 mL de etanol gelado, para precipitação do RNA viral. Após homogeneização, a mistura foi incubada a -20 °C por 18 horas e depois centrifugada a 13000x g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os microtubos invertidos para a secagem total do sedimento. Em seguida, os sedimentos foram ressuspensos em 40 µL da solução dissociante de ácido nucléico (TRIS/HCl 0,0625 M pH 6,8; Uréia 5M; SDS

3%; Mercapetoetanol 5%; Azul de Bromofenol 0,01%) e incubados a 56 °C durante 15 minutos.

3.2.3.2 *Preparo do gel de poliacrilamida*

Preparou-se um gel de poliacrilamida com concentrações diferentes de acrilamida-bisacrilamida, sendo 7% a fase separadora (gel inferior) e de 3,5% a fase concentradora (gel superior).

O gel contínuo foi preparado em placas de vidro de 95x95 mm com espaçadores de 1,0 mm de espessura, sendo dois laterais e um na base. A vedação das laterais e da parte inferior foi feita com ágar a 2%. Após a montagem das placas, adicionou-se o gel separador composto de 7% de acrilamida-bisacrilamida, tetrametilenodiamina (TEMED) e 2% de persulfato de amônio. Após a polimerização da primeira fase, adicionou-se o gel concentrador composto de 3,5% acrilamida-bisacrilamida, TEMED e 2% de persulfato de amônio, imediatamente introduziu-se um pente com 12 depressões para a formação das canaletas de introdução das amostras. Após a polimerização do gel superior, foi retirado o espaçador inferior juntamente com a vedação e as placas foram fixadas numa cuba de acrílico vertical para corrida eletroforética. Foi vedado o contato das placas com a cuba, utilizando-se ágar a 2%. Em seguida, os reservatórios da cuba foram preenchidos com tampão de corrida TRIS/glicina pH 8,3, e retirou-se o pente.

Foram distribuídas 20 µL das amostras nas canaletas, reservando uma para amostra padrão de origem símia - SA 11 e origem humana Wa.

O gel foi submetido a uma corrente elétrica de 40 mA (mili-ampére) durante 3 horas, à temperatura ambiente.

Em seguida, o gel de poliacrilamida foi corado com nitrato de prata de acordo coma

técnica descrita por Herring et al. (1982). O gel foi retirado das placas e colocado em um recipiente contendo solução de etanol 10% e ácido acético 0,5%, como fixador por 30 minutos, com agitação constante. Em seguida, esta solução foi retirada e adicionados 100 mL da solução de nitrato de prata a 0,011M, durante 30 minutos, com agitação constante. A seguir, a solução foi retirada e o gel foi lavado 3 vezes com água destilada.

Em seguida foram adicionados 125 mL de solução contendo NaOH 0,75M e formaldeído 0,95% (solução reveladora), sendo o recipiente agitado levemente até o aparecimento dos segmentos de dsRNA viral. A revelação foi interrompida pela adição de ácido acético 5% por 15 minutos. Adicionou-se ao gel uma solução de etanol a 10% para conservação do gel até o momento de fotografar e secar.

3.2.4 Caracterização molecular das amostras de RVs-A em G (VP7) e P (VP4) por transcrição reversa - reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR)

Para genotipagem das amostras de rotavírus, utilizou-se a técnica *RT-PCR*, utilizando sequências de oligonucleotídeos (*primers*) específicas para gene 4 (VP4) conforme descrito por Gentsh et al. (1992) e para gene 9 (VP7), conforme descrito por Gouvea et al. (1990b; 1994b,c).

As sequências de *primers* utilizadas para caracterização molecular dos RVs estão descritos nos quadros 6 e 7.

Quadro 6 - Sequências de *primers* empregadas na RT-PCR para caracterização em genótipos P (VP4) das amostras de RVs-A.

<i>Primer</i>	Seqüência 5' - 3' - gene 4	Posição	Amostra Genótipo	Tamanho do segmento (pb)	
con3	TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A	11-32	Consenso	876pb	Gentsch et al. (1992)
con2	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	868-887	Consenso		Gentsch et al. (1992)
1T-1	TCT ACT TGG ATA ACG TGC	339-356	KU (P[8])	345pb	Gentsch et al. (1992)
2T-1	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	474-494	RV5 (P[4])	483pb	Gentsch et al. (1992)
3T-1	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	259-278	1076 (P[6])	267pb	Gentsch et al. (1992)
4T-1	TGA GAC ATG CAAT TGG AC	385-402	K8 (P[9])	391pb	Gentsch et al. (1992)
5T-1	ATC ATA GTT AGT AGT CCG	575-594	69M (P[10])	583pb	Gentsch et al. (1992)
BL-36	TGA TTG AGC TTT TAA TGA TAT CAC	736-759	HCR3 (P[3])	748pb	Li et al. (1993)
pNCDV	CGA ACG CGG GGG TGG TAG TTG	269-289	Bo/NCDV (P[1])	622pb	Gouvea et al. (1994b)
pUK	GCC AGG TGT CGC ATC AGA G	336-354	Bo/UK (P[5])	555pb	Gouvea et al. (1994b)
pOSU	CTT TAT CGG TGG AGA ATA CGT CAC	389-412	Po/OSU (P[7])	502pb	Gouvea et al. (1994b)
pGott	GCT TCA ACG TCC TTT AAC ATC AG	465-487	Po/Gottfried (P[6])	423pb	Gouvea et al. (1994b)
pB223	GGA ACG TAT TCT AAT CCG GTG	574-594	Bo/223 (P[11])	314pb	Gouvea et al. (1994b)

3.2.4.1 Identificação da amostra

No presente trabalho, as amostras de RVs selecionadas para caracterização molecular foram identificadas utilizando as iniciais IAL (Instituto Adolfo Lutz), seguido da letra R (Rotavírus), número sequencial contínuo, contendo barra e ano.

Quadro 7 - Sequências de *primers* empregadas na RT-PCR para caracterização em genótipos G (VP7) das amostras de RVs-A.

Primer	Sequência 5' - 3' – gene 9	Posição	Amostra (Genótipo)	Tamanho do segmento	Referência
Beg 9	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	1-28	Consenso	1062pb	Gouvea et al. (1990b)
End 9	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	1062-1036	Consenso	1062pb	Gouvea et al. (1990b)
RVG9	GGT CAC ATC ATA CAA TTC T	1062-1044	SA11 (G3)	-	Gouvea et al. (1990b)
sBeg 9	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC	1-21	WA (G1)	-	Gouvea et al. (1990c)
aBT1	CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G	314-335	Wa (G1)	749pb	Gouvea et al. (1990b)
aCT2	CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G	411-435	DS1 (G2)	652pb	Gouvea et al. (1990b)
aET3	CGT TTG AAG AAG TTG CAA CAG	689-709	P (G3)	374pb	Gouvea et al. (1990b)
aDT4	CGT TTC TGG TGA GGA GTT G	480-498	ST3 (G4)	583pb	Gouvea et al. (1990b)
aFT9	CTA GAT GTA ACT ACA ACT AC	757-776	WI61 (G9)	306pb	Gouvea et al. (1990b)
FT5	CAT GTA CTC GTT GTT ACG TC	779-760	Po/0SU (G5)	780pb	Gouvea et al. (1990c)
DT6	CTA GTT CCT GTG TAG AAT C	499-481	Bo/UK (G6)	500pb	Gouvea et al. (1990c)
HT8	CGG TTC CGG ATT AGA CAC	273-256	B37 (G8)	274pb	Gouvea et al. (1990c)
ET10	TTC AGC CGT TGC GAC TTC	714-697	Bo/B223 (G10)	715pb	Gouvea et al. (1990c)
BT11	GTC ATC AGC AAT CTG AGT TGC	336-316	Po/YM (G11)	337pb	Gouvea et al. (1990c)
VG86	TTA CAG AGA AGG ACG CTA TGT CA	436-459	L26 (G12)	436pb	Taniguchi et al. (1990).

3.2.4.2 Extração do RNA viral – Método TRIZOL[®]

O RNA viral foi extraído diretamente das fezes utilizando Trizol[®] (Lyfe Technologies Inc), conforme instruções do fabricante (CHOMEZYNSKI e SACCHI, 1987).

Em um microtubo com capacidade para 1,5 mL foi feita uma suspensão a 10% de fezes com 1.000 µL de Trizol[®]. A mistura foi homogeneizada manualmente e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente (15 °C a 30 °C). Em seguida foram adicionados 200 µL de clorofórmio, para separação da fase aquosa que contém o RNA viral, homogeneizado em *vortex* por 15 s e incubados a T °C ambiente por 3 min, em seguida os microtubos foram centrifugados por 15 minutos a 12000x g. Ao

sobrenadante foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico para precipitação do RNA. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente centrifugou-se por 10 minutos a 12000x *g*, o sobrenadante foi removido e descartado. Em seguida, o sedimento foi lavado com 1000 µL de etanol a 75%, homogeneizado em *vortex* e centrifugado por 5 minutos a 12000x *g*. O sedimento foi seco pela inversão do microtubo sobre um papel absorvente por 10 minutos. Em seguida o RNA foi ressuspensão em 40 µL de água Milli-Q estéril, incubado por 10 minutos a 55 °C (em bloco térmico) e estocado -70 °C até o momento do uso.

3.2.4.3 RT-PCR

Na primeira amplificação para a detecção dos genes 4 e 9 dos rotavírus, foram utilizados os dsRNA dos vírus extraídos como moldes para serem transcritos em cópias de ds DNA (cDNA), e em seguida, serem genotipados por RT-PCR.

Foi utilizado um microtubo para cada reação (VP4 e VP7) com capacidade de 650 µL. Utilizou-se para cada reação 5 µL do RNA viral juntamente com 3 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) e aquecidos a 95 °C por 5 minutos, para abrir e manter a fita dupla de RNA aberta. Após esse período, as suspensões foram imediatamente resfriadas em banho de gelo por 5 minutos e adicionados 42 µL da seguinte mistura: 14 µL de água destilada esterilizada, 16 µL da mistura de dioxinucleotídeos trifosfato (contendo soluções de dATP, dGTP, dCTP e dTTP 1,25 mM), 5 µL de tampão da reação 10 vezes concentrado (contendo TRIS-HCl 100 mM pH 9,0; KCl 500mM, e Triton X-100 1% - Promega Madison, WI.), 5 µL da solução de Cloreto de Magnésio

(MgCl₂) 25mM, 2 µL da solução de cada *primer* contendo 25 µM de con2-con3 para amplificar a porção do gene 4 e 2 µL da solução de *primer* contendo 20 µM de Beg9-End9 para amplificar todo o gene 9, 4 unidades da enzima Transcriptase Reversa (Avian Myeloblastosis Virus, Super Transcriptase Reverse-Molecular Genetic Resources, Tampa, Fla.) e 2,5 unidades da enzima Taq DNA Polimerase (Promega). Os microtubos foram colocados em um termociclador (Gene Amp PCR System 9600-Perkin Elmer Cetus) programado para uma incubação inicial de 42 °C por 45 minutos, para a etapa da transcrição reversa e obtenção do cDNA, e em seguida foram submetidos a uma série de 30 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto, 42 °C por 2 minutos, e 72 °C por 1 minuto), e uma incubação final de extensão a 72 °C por 7 minutos.

3.2.4.4 Semi-Nested PCR - (Genotipagem)

Nesta etapa, 1 µL do produto da primeira amplificação foi utilizado como molde para a 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 *pool de primers* específicos para os diferentes genótipos P (Con3, 1T-1, 2T-1, 3T-1, 4T-1, 5T-1 e HCR3), (Con2, pNCDV, pUK, pOSU, pGOTT e pB223) e G (RVG9, aBT1, aCT2, aDT4, aET3, aFT9), (sBeg9, FT5, DT6, HT8, ET10, BT11, VG86). Foram adicionados 21 µL da seguinte mistura: 7 µL de água destilada esterilizada, 8 µL da mistura de dioxinucleotídeos trifosfato (contendo soluções de dATP, dGTP, dCTP e dTTP 1,25 mM), 2,5 µL de tampão 10 vezes concentrado (contendo TRIS-HCl 100 mM, pH 9,0;

KCl 500mM, e Triton X-100 1% - Promega Madison, WI.), 2,5 µL da solução de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) 25mM, 1 µL do *pool de primer* específico para cada genótipo e 2,5 unidades da enzima Taq DNA-Polimerase (Promega). Os microtubos foram novamente colocados em um termociclador (Gene Amp PCR System 9600 - Perkin Elmer Cetus) programado para 25 ciclos de "PCR" a uma incubação de 94 °C por 1 minuto, 50 °C por 2 minutos, e 72 °C por 1 minuto, e uma incubação de extensão final de 72 °C por 7 minutos.

3.2.4.5 *Análise por eletroforese em gel de agarose*

Alíquotas de 7 µL dos produtos da primeira e segunda amplificação homogeneizados com 3 µL de tampão de corrida (azul de bromofenol a 0,1%, EDTA 0,1mM, glicerol a 50%) foram aplicadas em um gel contendo 1,2% de agarose-Nusieve (FMC Bio Products, Rockland, Maine) em Tampão TRIS-Borato (TBE - TRIS 0,089 M; ácido bórico 0,089 M; e EDTA 0,002M, pH8,0), com 0,5 µg de brometo de etídeo por mililitro. Para cada gel foram aplicados 3 microlitros do padrão de tamanho molecular 100 pares de base (100 bp DNA Ladder - Invitrogen). Em seguida, os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 120 V por 1 hora, a temperatura ambiente. Após a eletroforese, os géis foram analisados por transiluminação com luz ultravioleta e fotografados com filme Polaroid 667.

3.2.5 **Identificação de surto de diarréia**

Foi considerado surto de diarréia: quando **dois ou mais casos** devido a um

mesmo agente etiológico, isto é, com confirmação laboratorial para rotavírus, apresentaram um elo epidemiológico/fonte comum entre eles identificado por investigação epidemiológica (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2008).

3.2.6 Sequenciamento do gene 9 (VP7).

Foram selecionadas amostras de RVs que apresentaram produto do RT-PCR visível em gel de agarose, e sem bandas extras e representantes de diferentes anos. Os cDNAs do gene 9 (VP7) sorotipo G1 gerados por RT-PCR foram purificados utilizando Kit Wizard[®] SV Gel e PCR Clean-UP System (Promega Corporation, Madison, USA). A quantificação de DNA foi realizada utilizando o espectrofotômetro Beckman Coulter USA Mod DU 640B, com o programa NanoDrop-1000 V3. 10. As reações de sequenciamento foram realizadas pelo método *do dideoxynucleotide chain terminator* (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), utilizando o Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA. Os *primers* Beg9, End9, W e Y foram utilizados nas reações de sequenciamento cDNA na concentração de 1 a 10 pmol (Tabela 1). Os produtos do sequenciamento foram purificados utilizando o Kit Performa[®] DTR Gel Filtration Cartridges (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD). Todos os métodos foram realizados seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado no aparelho automático modelo ABI Prism 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Inc).

Tabela 1 - Sequências de *primers* empregadas no sequenciamento do gene 9 (VP7) das amostras de RVs-A selecionadas.

<i>Primer</i>	Sequência 5`- 3` - gene 9	Posição	Amostra Sorotipo G	Referência
Beg9	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	1-28	Wa (1)	Gouvea et al. (1990)
End9	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	1062 -1036	SA11 (3)	Gouvea et al. (1990)
W	ATT TAT CCC ATC AAC GAC ATC	750 - 730	Wa (1)	Neste estudo
Y	TGT TGA TTT TTC TGT TGA CCC AC	420 - 442	Wa (1)	Neste estudo

3.2.6.1 Alinhamento

As sequências obtidas foram editadas utilizando o programa Sequencher (Gene Codes Corp, Ann Arbor, MI). Em seguida foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X versão 1.8.2-1 (THOMPSON et al., 1997) e manualmente editado em Bioedit versão 7.0.9 (HALL, 1999).

3.2.6.2 Inferência Filogenética

Árvore filogenética foi estabelecida pelo critério da Máxima Verossimilhança (ML) (FELSENSTEIN, 1981) utilizando o software PhyML (GUINDON et al., 2005) com 1.000 pseudo-repetições bootstrap. Em seguida para cada conjunto de dados, os valores de parâmetro para o melhor modelo de ajuste de substituição de nucleotídeos foram determinados por *AKAIKE Information Criterion* (AIC) (AKAIKE, 1974) estimados pelo programa MODELTEST (POSADA e CRANDALL, 1998). O modelo de substituição selecionado com maior grau de liberdade corresponde ao GTR+I₄+I para VP7. O conjunto de dados das sequências continha toda região codificante da VP7 do rotavirus

(978pb).

As sequências representativas dos grupamentos conhecidos foram obtidas do GenBank (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2010) para análise filogenética e estão descritas no quadro 8.

Quadro 8 – Amostras padrões utilizadas no estudo para análise filogenética contendo número de acesso no NCBI, hospedeiro, genótipo do RV-A e país de origem.

Amostra	Nº de acesso	Hospedeiro	Genótipo VP7	País
Wa	K02033	Humano	G1	EUA
AU19	AB018697	Humano	G1	Japão
Ban48	U26364	Humano	G1	Bangladesh
Brz-5	U26367	Humano	G1	Brasil
Brz-6	U26368	Humano	G1	Brasil
Chi-46	U26372	Humano	G1	China
Chi-45	U26371	Humano	G1	China
Cos-69	U263769	Humano	G1	Costa Rica
Cos-70	U26370	Humano	G1	Costa Rica
D	EF672574	Humano	G1	EUA
Egy-7	U26373	Humano	G1	Egito
Egy-8	U26374	Humano	G1	Egito
Isr-56	U26376	Humano	G1	Israel
Kor-54	U26377	Humano	G1	Korea
Kor-64	U26378	Humano	G1	Korea
Mo-12	U26381	Humano	G1	EUA
Mo-15	U26382	Humano	G1	EUA
Nb-49	U26383	Humano	G1	EUA
Oh-40	U26386	Humano	G1	EUA
Oh-64	U26387	Humano	G1	EUA
Tn-39	U26393	Humano	G1	EUA
Zam-52	U2639	Humano	G1	Zambia
PoC-95	L24165	Suíno	G1	EUA
PoC-60	L24164	Suíno	G1	EUA
ST3	EF672616	Humano	G4	Reino Unido

4 RESULTADOS

4.1 DETECÇÃO DE RV-A

Durante vigilância conduzida das doenças diarréicas agudas, foram analisadas 8.961 amostras fecais provenientes de pacientes atendidos nas Unidades de Saúde Pública ou Hospitais Públicos do Estado de São Paulo, entre 1996 a 2006. No total, os RVs foram detectados em 1.784 amostras (20,0%) utilizando ELISA para triagem de RV-A (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição temporal de RVs detectados em amostras de pacientes com quadro de diarréia aguda, provenientes do Estado de São Paulo, entre o período de 1996 e 2006.

Ano	Amostras analisadas por ELISA n ^o	Rotavírus positivo n ^o (%)
1996	187	33 (17,6)
1997	380	121 (31,8)
1998	210	45 (21,4)
1999	341	99 (29,0)
2000	407	98 (24,1)
2001	351	57 (16,2)
2002	413	90 (21,8)
2003	812	231 (28,4)
2004	3.408	699 (20,5)
2005	1.227	138 (11,2)
2006	1.225	173 (14,1)
Total	8.961	1.784 (20,0)

A infecção por RV foi predominantemente detectada nos meses mais frios e secos, apresentado um pico nos meses de Agosto e Setembro. Nos períodos mais quentes entre Novembro e Fevereiro observa-se o declínio abrupto no número de casos positivos para rotavírus (Figura 7).

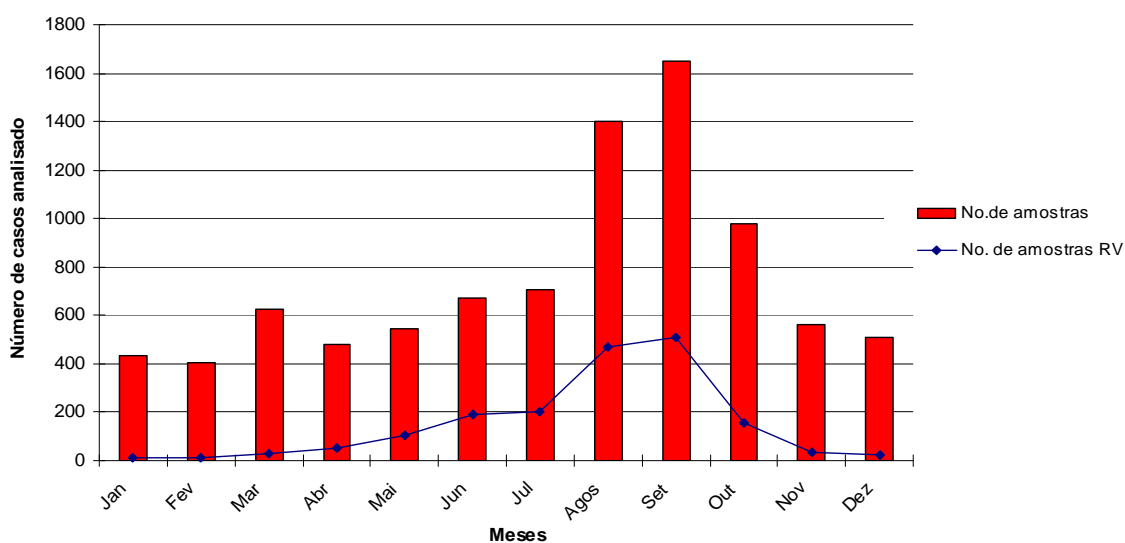


Figura 7. Distribuição sazonal de RVs detectados em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo, entre o período de 1996 e 2006.

Informações referentes à faixa etária foram possíveis obter de 1.563 (87,6%) de 1.784 casos positivos para rotavírus. A infecção por RV foi observada principalmente em crianças menores de dois anos de idade (1.085 [69,4%] de 1.563) e o pico de incidência ocorreu em crianças na faixa etária de 7 a 12 meses (40,2%; 629/1563). A detecção dos rotavírus em crianças jovens e adultos/idosos foi 7,5% (117/1563) e 7,8% (122/1563), respectivamente (Figura 8).

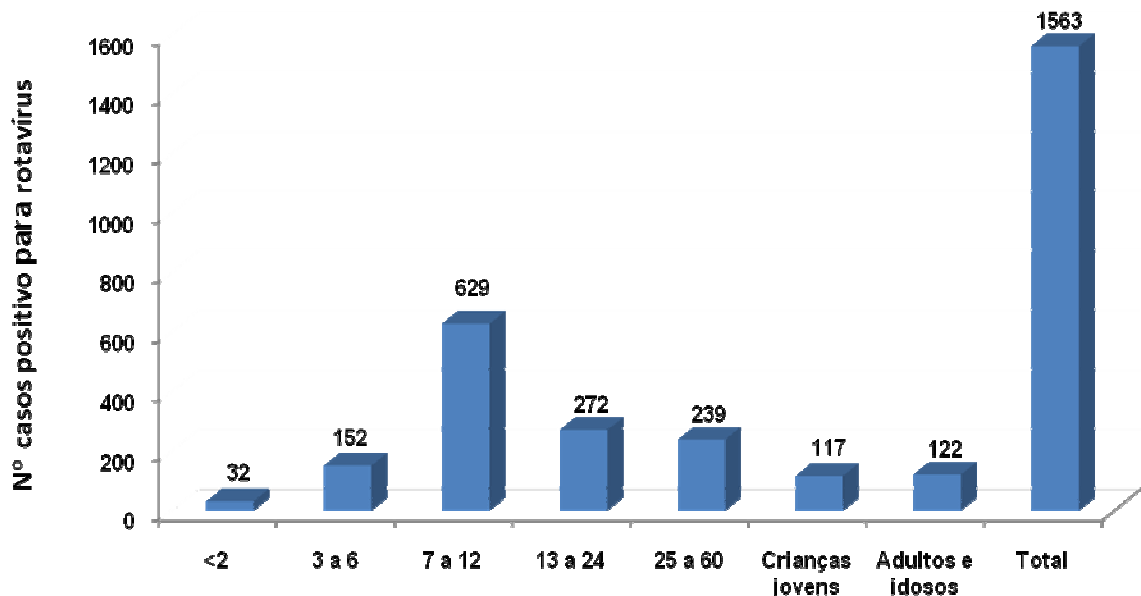


Figura 8. Distribuição de RVs de acordo com a faixa etária, em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo, entre o período de 1996 e 2006.

4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS RVs EM GENÓTIPOS G (VP7) E P (VP4).

Durante o período de 11 anos analisado, foram selecionadas 1.300 amostras de 1.784 positivas para rotavírus (73,0%) para sua caracterização em genótipos G e P por RT-PCR.

Foram caracterizadas 1.019 (78,4%) amostras de rotavírus em relação ao genótipo G (VP7), e 748 (57,5%) em relação ao genótipo P (VP4).

As associações P (VP4) e G (VP7) dos rotavírus foram determinadas em 51,5% (670/1300) das amostras analisadas. Entre essas amostras de RVs genotipadas em G (VP7), 349 amostras (52,1%) não tiveram o tipo P determinado e entre as amostras

genotipadas em P (VP4), 78 (11,6%) não tiveram seu tipo G determinado.

O genótipo G1 foi o mais frequente entre as amostras de rotavírus (457; 35,2%), seguidos dos tipos G9 (405; 31,2%), G2 (51; 4,0%), G3 (46; 3,5%), G4 (29; 2,2%) e G12 (7; 0,5%). A emergência do genótipo G9 pôde ser verificada a partir do ano 2000, sendo o tipo mais predominante nos anos 2002 (23; 41,8%), 2004 (262; 43,4%) e 2005 (37; 32,7%). Nota-se, que em 2006, o tipo G2 foi o mais frequente entre os tipos G de rotavírus, representando 28,9% das infecções, seguidos dos tipos G9, G1 e G3 (Tabela 3, figura 9). O genótipo G12 foi detectado em amostras de crianças menores de 5 anos de idade, provenientes do município de Guarulhos. Este achado fez parte de um estudo prospectivo conduzido no Estado de São Paulo, em parceria com a Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Vigilância Epidemiológica e Instituto Adolfo Lutz, entre fevereiro de 2004 e fevereiro de 2005, com objetivo de estimar a incidência da doença diarréica por rotavírus em crianças menores de 5 anos de idade. O estudo foi desenvolvido nos municípios de Guarulhos e Rio Claro, considerados representativos das regiões da Grande São Paulo e municípios do interior, respectivamente.

A partir do ano 2000 foi possível verificar em 24 amostras (1,8%) mistura de genótipos G de rotavírus, com diferentes combinações, ou seja, 16 tipos G1+G9, 4 tipos G2+G9 e 1 tipo cada de G1+G2, G2+G3, G3+G9 e G4+G9. As misturas foram confirmadas utilizando *primers* únicos específicos (Tabela 4).

Na tabela 5 está apresentada a distribuição temporal dos genótipos P (VP4) de rotavírus. Observa-se que o genótipo P[8] foi o mais predominante (624; 48%) em todos os anos, seguidos dos tipos P[4] (76; 5,8%), P[6] (18; 1,4%), P[9] (8; 0,6%),

P[10] (5; 0,4%) e P[3] (3; 0,3%). Entretanto, nota-se a exceção em 2006, onde genótipo P[4] foi o mais frequente entre os tipos de rotavírus (47; 31%) (Figura 10).

Misturas de genótipos P foram detectadas em apenas 13 amostras (1,0%) e todas foram confirmadas utilizando *primers* únicos específicos (Tabela 5).

Tabela 3 - Distribuição temporal dos genótipos G (VP7) de rotavírus em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo, entre o período de 1996 e 2006.

Ano	n° de rotavírus selecionado	G1 n (%)	G2 n (%)	G3 n (%)	G4 n (%)	G9 n (%)	G12 n (%)	Infecção Mista n (%)	NT ^a n (%)
1996	21	19(90,5)	2(9,5)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
1997	49	45(92,0)	0(0,0)	0(0,0)	3(6,1)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	1(2,0)
1998	16	12(75,0)	0(0,0)	0(0,0)	4(25,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
1999	58	46(79,3)	0(0,0)	0(0,0)	10(17,2)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	2(3,5)
2000	57	42(73,7)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	7(12,3)	0(0,0)	3(5,2)	5(8,8)
2001	43	28(65,1)	2(4,7)	1(2,3)	6(13,9)	4(9,3)	0(0,0)	1(2,3)	1(2,3)
2002	55	18(32,7)	0(0,0)	2(3,6)	4(7,3)	23(41,8)	0(0,0)	2(3,6)	6(11,0)
2003	132	84(63,6)	1(0,8)	0(0,0)	0(0,0)	40(30,3)	0(0,0)	2(1,5)	5(3,8)
2004	604	114(18,9)	1(0,2)	40(6,6)	2(0,3)	262(43,4)	7(1,1)	4(0,7)	174(28,8)
2005	113	25(22,1)	1(0,9)	1(0,9)	0(0,0)	37(32,7)	0(0,0)	2(1,8)	47(41,6)
2006	152	24(15,8)	44(28,9)	2(1,3)	0(0,0)	32(21,1)	0(0,0)	10(6,6)	40(26,3)
Total	1.300	457(35,2)	51(4,0)	46(3,5)	29(2,2)	405(31,2)	7(0,5)	24(1,8)	281(21,6)

^a NT: Não Tipado

Figura 9. Distribuição dos genótipos G (VP7) de rotavírus em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo, entre o período de 1996 e 2006.

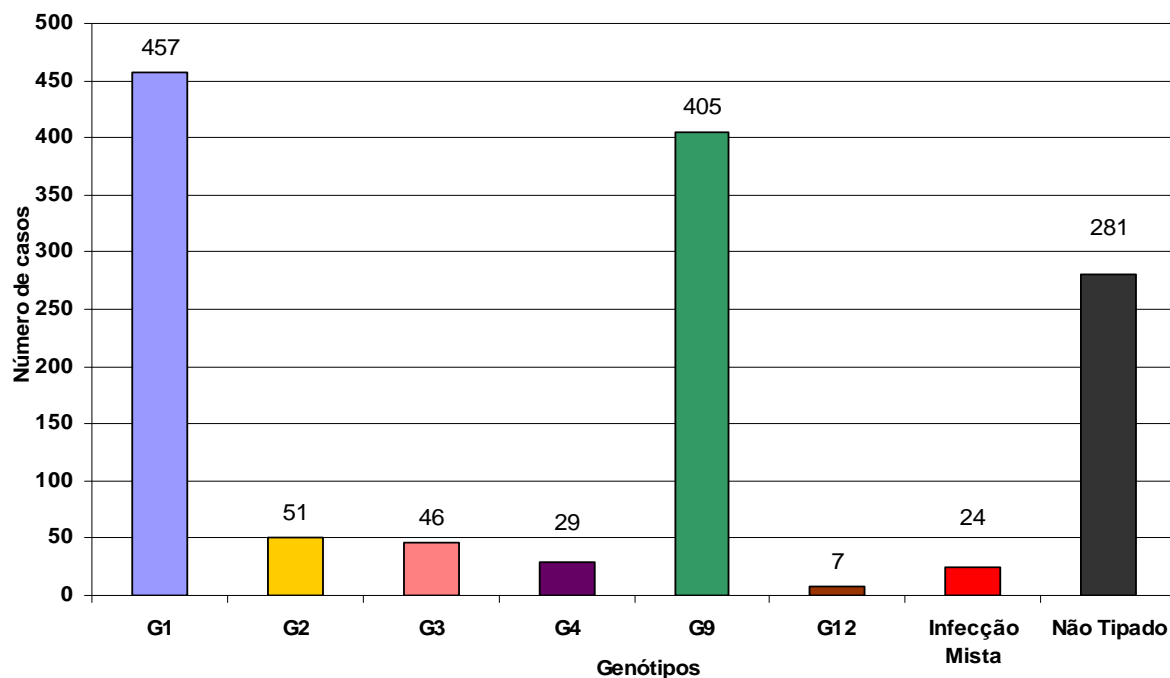


Tabela 4 - Distribuição de mistura de genótipos G (VP7) de rotavírus em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo.

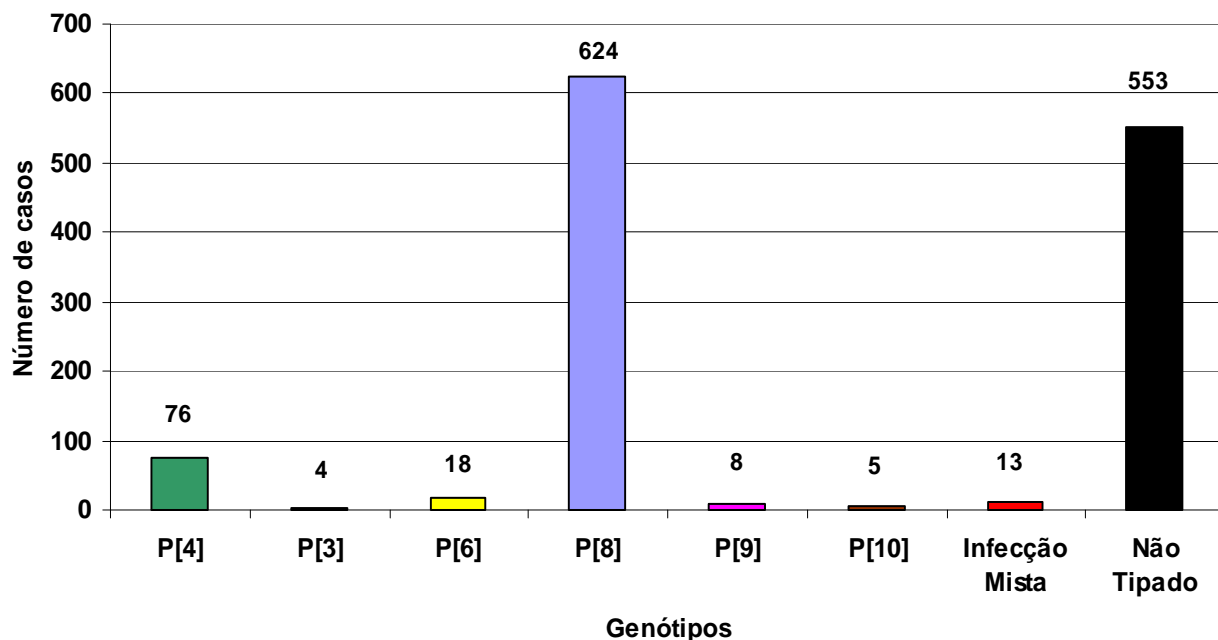
Infecção Mista							
Ano	G1+G9	G1+G2	G2+G3	G2+G9	G3+G9	G4+G9	Total
2000	3	0	0	0	0	0	3
2001	0	0	1	0	0	0	1
2002	1	0	0	0	0	1	2
2003	2	0	0	0	0	0	2
2004	3	0	0	0	1	0	4
2005	2	0	0	0	0	0	2
2006	5	1	0	4	0	0	10
Total	16	1	1	4	1	1	24

Tabela 5 - Distribuição temporal dos genótipos P (VP4) de rotavírus em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo, entre o período de 1996 a 2006.

Ano	n° de rotavírus selecionado	P[4] N° (%)	P[3] n° (%)	P[6] n° (%)	P[8] n° (%)	P[9] n° (%)	P[10] n° (%)	Infecção Mista ^a n (%)	NT ^b n° (%)
1996	21	5 (23,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	14 (66,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (9,5)
1997	49	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	31 (63,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	18 (36,7)
1998	16	1 (6,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	15 (93,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
1999	58	2 (3,5)	0 (0,0)	1 (1,7)	50 (86,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,7)	4 (6,9)
2000	57	1 (1,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	49 (85,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (12,3)
2001	43	5 (11,6)	0 (0,0)	3 (7,0)	21 (48,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,3)	13 (30,2)
2002	55	3 (5,4)	0 (0,0)	1 (1,8)	44 (80,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,8)	6 (11,0)
2003	132	6 (4,5)	0 (0,0)	1 (0,8)	121 (91,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (3,0)
2004	604	4 (0,7)	4 (0,7)	9 (1,5)	230 (38,0)	8 (1,3)	4 (0,7)	5 (0,8)	340 (56,3)
2005	113	2 (1,8)	0 (0,0)	1 (0,9)	23 (20,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	87 (77,0)
2006	152	47 (31,0)	0 (0,0)	2 (1,3)	26 (17,1)	0 (0,0)	1 (0,6)	5 (4,4)	71 (46,7)
Total	1.300	76 (5,8)	4 (0,3)	18 (1,4)	624 (48,0)	8 (0,6)	5 (0,4)	13 (1,0)	552 (42,5)

^a Infecção Mista: 1999, P[4]+P[6] (n=1); 2001, P[6]+P[8] (n=1); 2002, P[6]+P[8] (n=1); 2004, P[3]+P[8] (n=4) P[8]+P[10] (n=1); 2006, P[3]+P[4] (n=4) e P[4]+P[8] (n=1). ^b NT: Não tipado.

Figura 10. Distribuição dos genótipos P (VP4) de rotavírus em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo, entre 1996 a 2006.



4.2.1 Associação P(VP4) e G(VP7) dos RVs

De acordo com a tabela 6, as associações P(VP4) e G(VP7) dos rotavírus foram determinadas em 51,5% (670/1300) das amostras analisadas. Destas, as associações mais comuns mundialmente como P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3, P[8]G4 e P[8]G9 representaram 92% (617/670) dos rotavírus. A associação mais frequente detectada entre as amostras de rotavírus foi P[8]G1 (50,8%; 341/670), seguidos P[8]G9 (29,1%; 195/670), P[4]G2 (5,4%; 36/670), P[8]G4 (3,6%; 24/670) e P[8]G3 (3,1%; 21/670). Infecções mistas e associações consideradas não usuais também foram observadas em 53 amostras (7,9%; 53/670).

Tabela 6 - Distribuição temporal da associação P (VP4) e G(VP7) de rotavírus em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo, entre o período de 1996 a 2006.

Associação P e G	1996 n°	1997 n°	1998 n°	1999 n°	2000 n°	2001 n°	2002, n°	2003 n°	2004 n°	2005 n°	2006 n°	Total n°
Genótipos Comuns												
P[8]G1	15	30	12	40	34	14	12	64	98	19	3	341
P[4]G2	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	31	36
P[8]G3	0	0	0	0	0	0	2	0	18	0	1	21
P[8]G4	0	2	3	10	0	7	2	0	0	0	0	24
P[8]G9	0	0	0	0	5	1	20	30	121	5	13	195
Genótipos não usuais												
P[4]G1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4
P[6]G1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
P[10]G1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1
P[4]G4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
P[3]G9	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	4
P[4]G9	0	0	0	0	0	0	1	3	1	1	2	8
P[6]G9	0	0	0	0	0	0	0	1	5	0	1	7
P[10]G9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2
P[9]G12	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	7
Infecção Mista												
P[4]+P[6]G1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
P[6]+P[8]G1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2
P[3]+P[4]G2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4
P[3]+P[8]G9	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3
P[8]G1+G9	0	0	0	0	3	0	0	1	0	0	0	4
P[6]G1+G9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
P[4]G2+G3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
P[8]G4+G9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Total	17	32	16	51	42	24	40	100	261	27	60	670

4.3 IDENTIFICAÇÃO DE SURTOS DE DIARRÉIA POR ROTAVÍRUS.

Entre as amostras de RVs que tiveram associação P e G caracterizada foi possível observar ao longo do estudo, 08 surtos de diarréia ocorridos em diferentes municípios do Estado de São Paulo, entre 2004 e 2006. A identificação foi realizada com a consulta dos dados de investigação epidemiológica de surtos do Centro de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Estado da Saúde (CVE/SES) e comparando com os dados laboratoriais disponíveis. Os dados epidemiológicos dos surtos estão disponíveis no relatório técnico, da SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, Centro de Vigilância Epidemiológica, Divisão de Doenças de Transmissão Hidrica e Alimentar, 2010 (Tabela 7).

Foi considerado surto a ocorrência de dois casos ou mais de diarréia relacionada entre si, numa mesma área geográfica e num mesmo período de tempo.

4.3.1 Surtos de diarréia nos municípios do Estado de São Paulo.

Entre os 8 surtos de diarréia por RVs identificados pela comparação de dados laboratoriais e epidemiológicos, um foi caracterizado como P[6]G9 no município de Brodowski, 3 surtos por P[8]G9 em Cerquilha, Sete Barras (Aldeia Pagua Ty) e Fernandópolis, 1 surto por P[8]G1 em Urânia, 1 surto P[8]G1+G9 em Martinópolis e 2 surtos por P[4]G2 nas cidades de Pitangueiras e Salto (Quadro 9).

Tabela 7 - Surtos de diarreia no Estado de São Paulo, período de 2004 e 2006.

Município/Região	Ano do Surto	Início do Surto	nº de casos	Fonte de transmissão	Local de ocorrência	Hosp ^c	Óbitos	Faixa etária (em anos)/ nº de casos					
								<1	1 - 4	5 -19	20 - 49	≥50	IGN
Brodowski/RP ^a	2004	11/07/2004	536	Desconhecida	Município	NI	0	75	141	129	191	0	0
Cerquilha/Sorocaba	2004	17/08/2004	22	Desconhecida	Município	NI	0	0	22	0	0	0	2
Urana/SJRP ^b	2004	13/08/2004	57	Desconhecida	Município	NI	0	0	5	80	0	2	0
Sete Barras/Registro	2005	24/02/2005	31	Pessoa-Pessoa	Aldeia Indígena Peguaó Ty	NI	0	0	03	0	0	0	28
Fernandópolis/SJRP	2006	23/07/2006	23	Pessoa-Pessoa	Difuso	23	0	3	15	5	0	0	0
Martinópolis/SJRP	2006	17/07/2006	173	Pessoa-Pessoa	Difuso	23	0	9	48	18	22	11	65
Pitangueiras/RP	2006	04/08/2006	150	Pessoa-Pessoa	Difuso	05	0	11	11	26	5	4	93
Salto/Sorocaba	2006	10/08/2006	9	Pessoa-Pessoa	Difuso	NI	0	03	0	01	01	0	1

FONTE: SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. "Alexandre Franjac", Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA), 2010. ^a: Ribeirão Preto; ^b: São José do Rio Preto; ^c:Hospitalização; NI: Não informado; IGN: Ignorado.

Quadro 9 - Análise das amostras fecais de 41 casos provenientes de 8 surtos de diarreia em diferentes municípios do Estado de São Paulo, entre 2004 e 2006.

MUNICÍPIO/Nº de CASOS	MÊS/ANO	IDADE	ELISA	RT-PCR P e G
Brodowski/5				
1	Julho/2004	68 anos	Negativo	NT
2	Julho/2004	69 anos	Positivo	P[6]G9
3	Julho/2004	NI	Positivo	P[6]G9
4	Julho/2004	NI	Positivo	NT
5	Julho/2004	NI	Positivo	NT
Cerquilha/5				
1	Julho/2004	7 meses	Positivo	P[8]G9
2	Julho/2004	8 meses	Positivo	P[8]G9
3	Julho/2004	9 meses	Positivo	P[8]G9
4	Julho/2004	1 ano	Positivo	P[8]G9
5	Julho/2004	2 anos	Positivo	P[8]G9
Urana/2				
1	Agosto/2004	1 ano	Positivo	P[8]G1
2	Agosto/2004	69 anos	Positivo	P[8]G1
Sete barras (Aldeia Indígena Paguaó Ty)/3				
1	Fevereiro/2005	1 ano	Positivo	P[8]G9
2	Fevereiro/2005	4 anos	Positivo	P[8]G9
3	Fevereiro/2005	NI	Positivo	P[8]G9
Fernandópolis/6				
1	Julho/2006	6 meses	Positivo	P[8]G9
2	Julho/2006	11 meses	Positivo	P[8]G9
3	Julho/2006	1 ano	Positivo	NT
4	Julho/2006	2 anos	Positivo	P[8]G9
5	Julho/2006	6 anos	Negativo	NR
6	Julho/2006	9 anos	Negativo	NR
Martinópolis/5				
1	Julho/2006	10 meses	Positivo	P[8]G1+G9
2	Julho/2006	11 meses	Positivo	P[8]G9+G1
3	Julho/2006	11 meses	Positivo	NT
4	Julho/2006	1 ano	Positivo	P[8]G1+G9
5	Julho/2006	1 ano	Positivo	P[8]G1+G9
Pitangueiras/8				
1	Agosto/2006	10 meses	Positivo	P[4]G2
2	Agosto/2006	1 ano	Positivo	P[4]G2
3	Agosto/2006	1 ano	Positivo	P[4]G2
4	Agosto/2006	1 ano	Negativo	NR
5	Agosto/2006	2 anos	Negativo	NR
6	Agosto/2006	3 anos	Positivo	P[4]G2
7	Agosto/2006	9 anos	Positivo	P[4]G2
8	Agosto/2006	52 anos	Negativo	NR
Salto/7				
1	Agosto/2006	2 meses	Negativo	NR
2	Agosto/2006	4 meses	Positivo	P[4]G2
3	Agosto/2006	1 ano	Positivo	P[4]G2
4	Agosto/2006	1 ano 5 meses	Negativo	NR
5	Agosto/2006	2 anos	Positivo	P[4]G2
6	Agosto/2006	9 anos	Negativo	NR
7	Agosto/2006	34 anos	Negativo	NR

NT: Não tipado; NR: Não realizado.

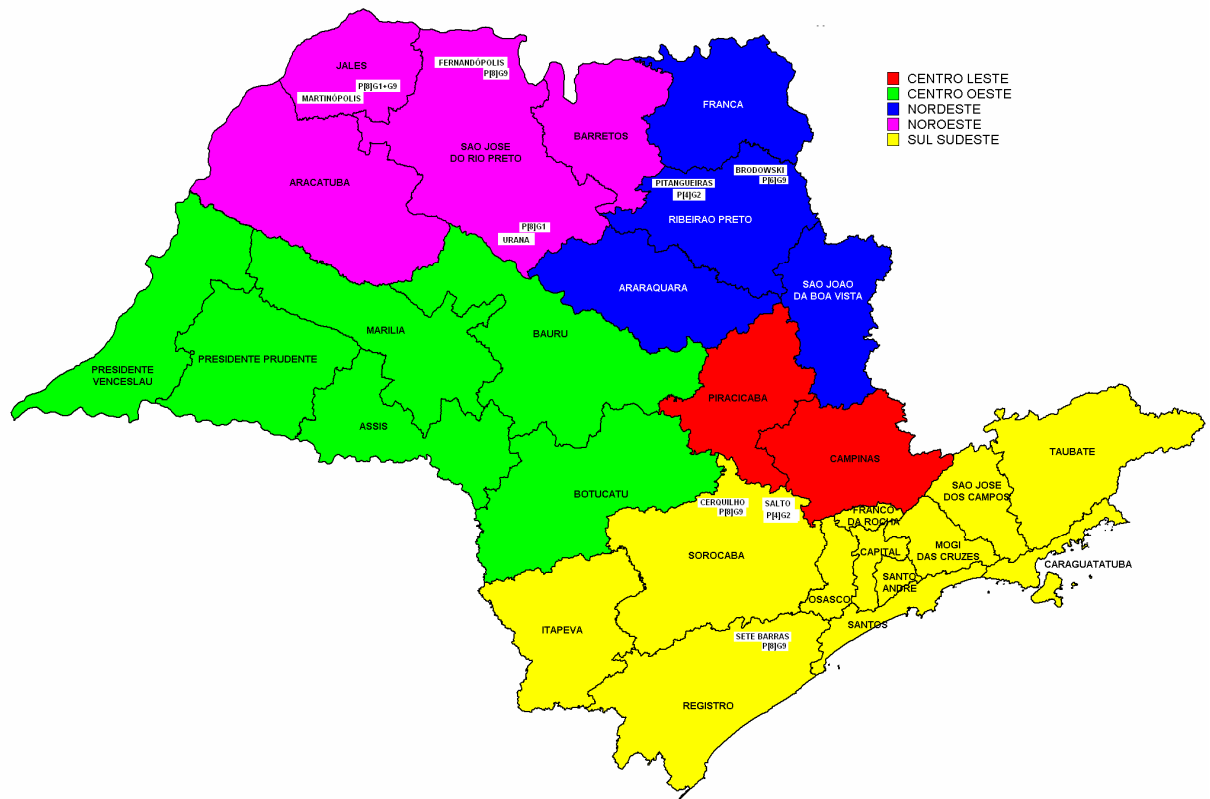


Figura 11. Mapa do Estado de São Paulo e as regiões dos Municípios onde ocorreram os surtos de diarreia aguda por RVs, entre 2004 e 2006.

4.4 SEQUENCIAMENTO DO GENE 9 VP7 G1

Foram selecionadas 38 amostras de rotavírus P[8]G1 entre aquelas que foram amplamente detectadas no presente estudo (n=341 P[8]G1) (Tabela 8). Como critério, selecionou-se as amostras de RVs que apresentaram produto do RT-PCR visível em gel de agarose, sem bandas extras e de diferentes locais e anos (Figuras 12 e 13).

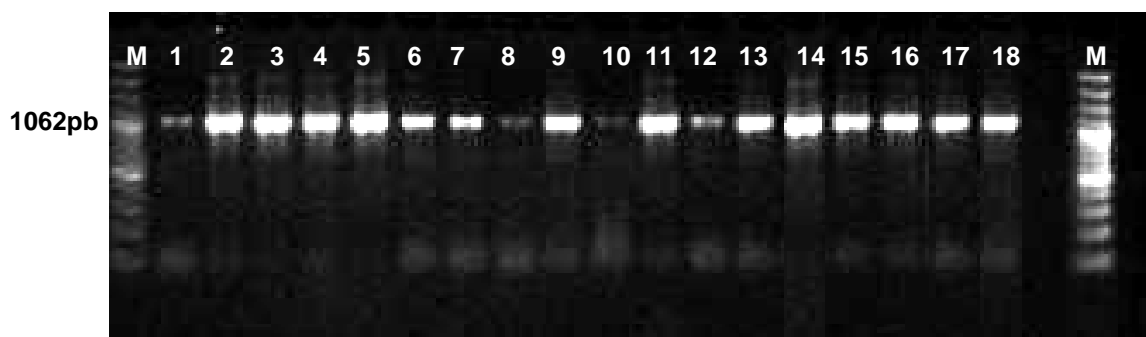


Figura 12. Amplificação do gene 9 (VP7) das amostras de rotavírus P[8]G1 por RT-PCR, canaletas correspondem às amostras 1 a 18; Padrão de tamanho molecular 100 pb (M).

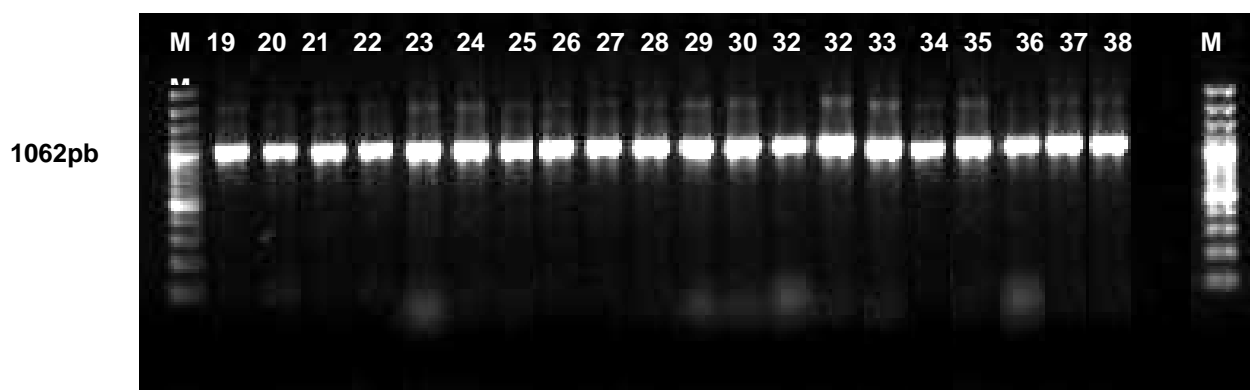


Figura 13. Amplificação do gene 9 (VP7) das amostras de rotavírus P[8]G1 por RT-PCR, canaletas correspondentes as amostras 19 a 38; Padrão de tamanho molecular 100 pb (M).

Tabela 8 - Amostras de RVs caracterizadas como P[8]G1 e selecionadas para reação de sequenciamento, entre 1996 e 2006.

CASO SÉRIE	IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	ANO	MÊS
1	IALR16	1996	Agosto
2	IALR23	1996	Agosto
3	IALR113	1996	Junho
4	IALR131	1997	Setembro
5	IALR137	1997	Setembro
6	IALR152	1998	Abril
7	IALR179	1998	Agosto
8	IALR215	1999	Junho
9	IALR224	1999	Junho
10	IALR233	1999	Junho
11	IALR270	2000	Março
12	IALR280	2000	Junho
13	IALR291	2000	Junho
14	IALR297	2000	Junho
15	IALR336	2001	Abril
16	IALR342	2001	Junho
17	IALR435	2002	Junho
18	IALR493	2002	Setembro
19	IALR577	2003	Agosto
20	IALR581	2003	Agosto
21	IALR627	2003	Setembro
22	IALR777	2004	Maio
23	IALR784	2004	Maio
24	IALR788	2004	Maio
25	IALRo50	2004	Junho
26	IALR795	2004	Junho
27	IALR796	2004	Junho
28	IALR799	2004	Junho
29	IALR1138	2005	Junho
30	IALR1139	2005	Junho
31	IALR1158	2005	Julho
32	IALR1159	2005	Julho
33	IALR1202	2005	Agosto
34	IALR1182	2005	Agosto
35	IALR1204	2005	Setembro
36	IALR1393	2006	Junho
37	IALR1451	2006	Agosto
38	IALR1616	2006	Agosto

Os eletroferótipos observados das 38 amostras de RVs P[8]G1 apresentaram heterogeneidade de perfis com variações nas posições entre os segmentos 2, 3, 4, 7, 8 e 9. Todos os perfis eletroforéticos apresentaram perfil longo (Figura 14 e 15).

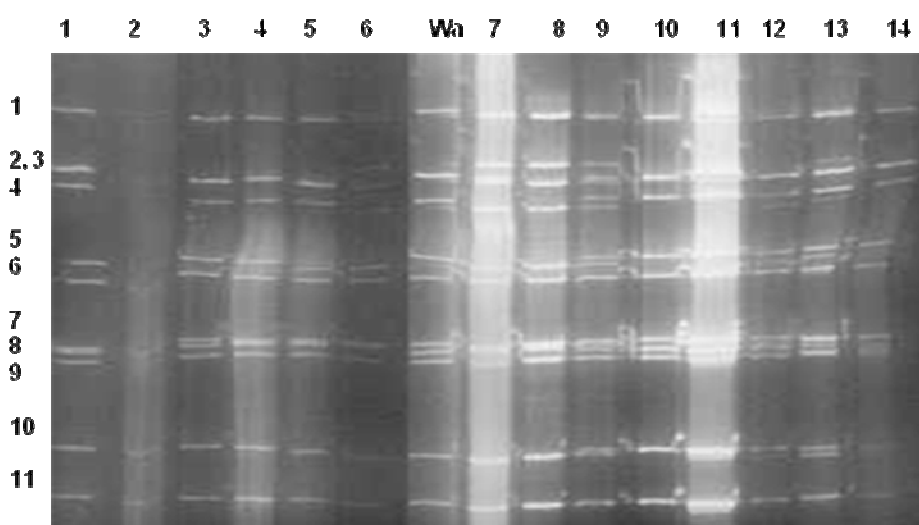


Figura 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida de amostras de rotavírus genótipo G1. Canaletas 1 a 14: amostras de alguns RVs selecionados para sequenciamento; Wa: amostra de referencia padrão G1.

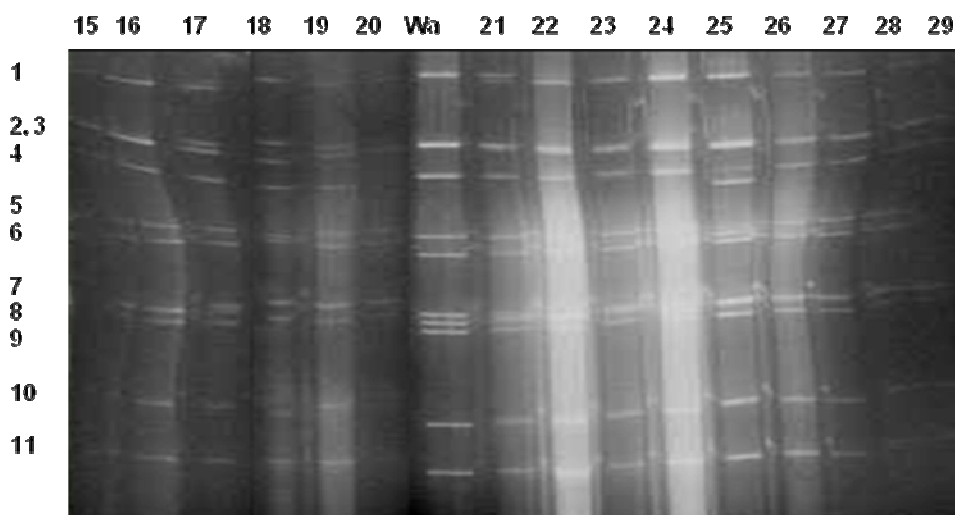


Figura 15. Eletroforese em gel de poliacrilamida. Eletroforótipos de amostras de rotavírus genótipo G1. Canaletas 15 a 29: amostras de alguns RVs selecionados para sequenciamento; Wa: amostra de referencia padrão G1.

Os genes VP7 das amostras de rotavírus G1 selecionados foram sequenciados e analisados por filogenia. A árvore filogenética mostrou que os genes VP7 das 38 amostras analisadas neste estudo foram agrupados em duas linhagens distintas: G1-I (17/38; 44,7%) e G1-II (21/38; 55,3%), comparados com as cepas de referência padrão (Figura 16). As amostras linhagens G1-I foram detectadas em 1996-1997, 2001-2002 e 2004-2006, enquanto que as amostras G1-II foram identificadas entre 1998 e 2001 e de 2003 a 2005 (Figura 17).

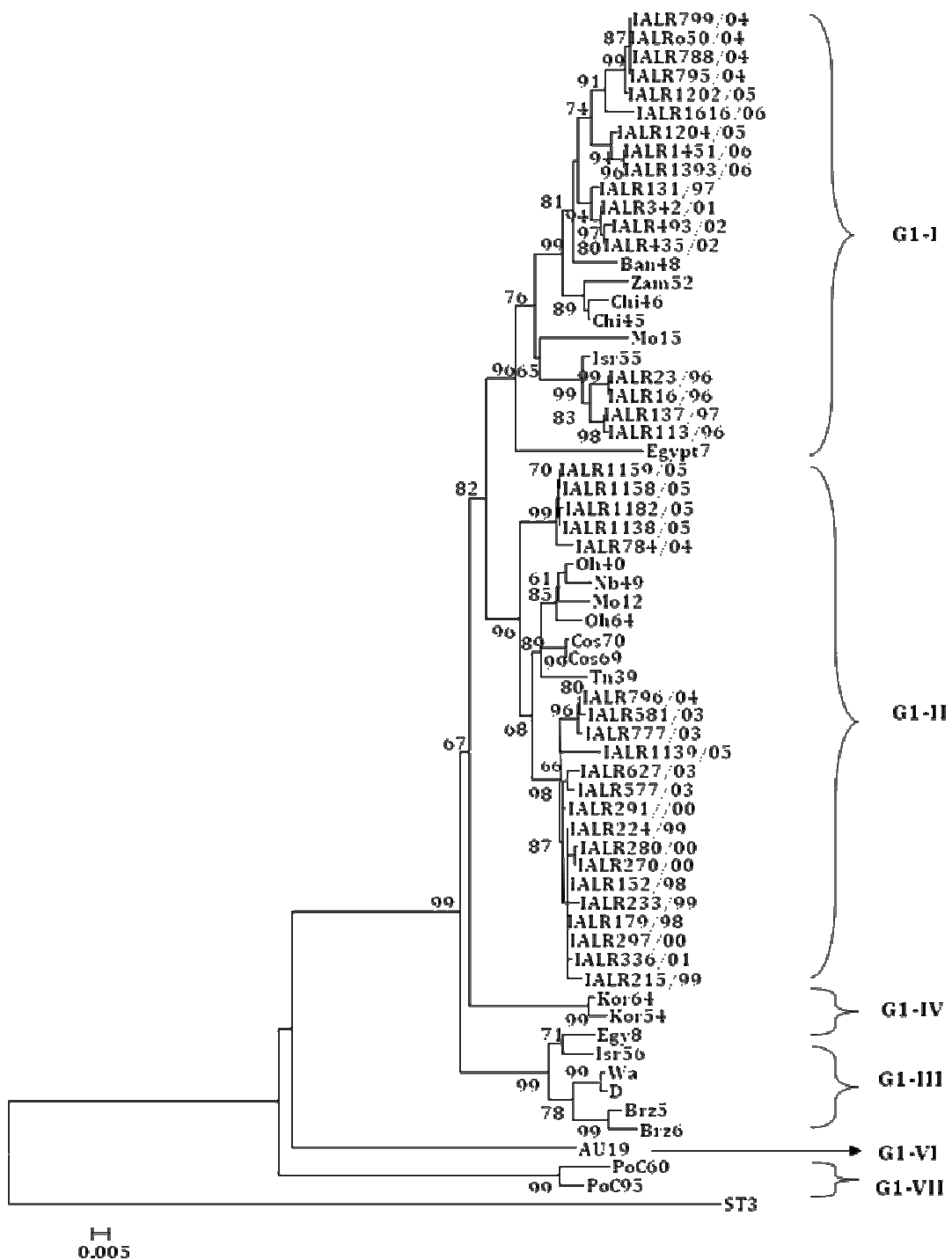


Figura 16. Análise filogenética das sequências nucleotídicas parciais do gene que codifica a proteína VP7 de 38 amostras rotavírus G1. A amostra padrão ST-3 foi utilizada como grupo externo para enraizar a árvore. A árvore filogenética foi construída utilizando critério Máxima Verossimilhança, cada ramo foi averiguado com procedimento estatístico de *bootstrap*, com 1.000 repetições.

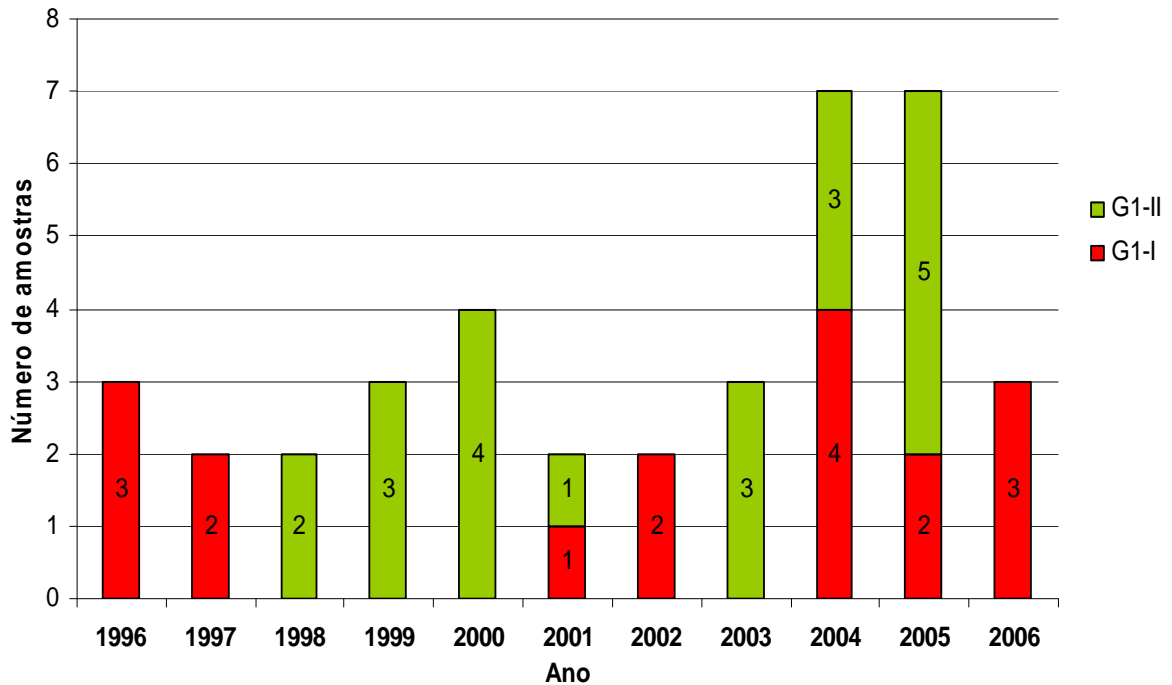


Figura 17. Distribuição temporal das linhagens G1 de rotavírus no Estado de São Paulo, entre 1996 e 2006.

Na figura 18 está apresentado o alinhamento da sequência de aminoácidos (aa) entre as amostras de rotavírus VP7 G1. Foram observadas vinte e três mudanças de aminoácidos em comparação com a amostra de referência padrão G1 Wa, identificado em 1974, e 17 mudanças se comparadas com a sequência mais antiga deste conjunto de dados, IALR113 isolado em 1996.

As alterações foram observadas ao longo de toda a sequência da proteína VP7, incluindo mutações identificadas nas regiões variáveis antigênicas VR5 (região antigênica A) e VR8 (região antigênica C). O alinhamento da sequência

deduzida de aminoácidos, com a amostra de referência padrão G1 Wa (linhagem III) tem mudanças específicas de aminoácidos nas regiões variáveis antigênicas (Figura 17).

As posições 65, 66 e 68 têm sido propostas para diagnóstico de VP7 G1 linhagens, no qual a sequência de aa TV-S classificaria as amostras de rotavírus G1 como linhagem I e a TA-A (ou com a terceira posição mais variável) como linhagem II (Figura 17).

No conjunto dos dados obtidos na análise, todas as amostras linhagem I VP7 continham as sequências de aa TV-S, porém apenas uma amostra observou-se a sequência TV-F (IALR1204) (Figura 18, Tabela 9).

Para linhagem II, todas as amostras continham a sequência de aa TA-A; com exceção em uma amostra, a IALR215, que apresentou a sequência TT-A, até então, nunca descrita para sequências de proteínas de amostras VP7 G1.

Na figura 18 observam-se as mudanças nas regiões antigênicas A, B e C ocorridas nas amostras de RVs ao longo do estudo. Na região A ocorreram mudanças de aa de Thr para Ile na posição 87 (T87I), Glu para Asp na posição 88 (E88D), Asn para Ser na posição 94 (N94S), Asp para Glu na posição 97 (D97E) e Asp para Asn na posição 100 (D100N); na região B ocorreu a mudança de aa de Ser para Asn na posição 147 (S147N) e na região C ocorreram as mudanças de aa de Asp para Asn na posição 213 (D213N), Met para Thr na posição 217 (M217T) e Thr para Val na posição 218 (I218V). Nas figuras 18 e 19

encontram-se exemplos de eletroferograma parcial de duas sequências de amostras de Rvs IALR280 e IALR1139, indicando as alterações observadas nas regiões antigênicas, D213N e D100N, respectivamente (Figuras 19 e 20).

Amostra/Ano/Lin*	Região A						Região B		Região C			Região F						
	37	VR3	55	65	VR4	76	87	VR5	101	141	VR7	150	208	VR8	224	234	VR9	242
Wa/74/III	FLLITVALFALTRAQNYGL			AVYTNSTQEEVF			TEASTQINDGDWKS			LMKYDQSLEL			QTTNVDSEFEMIAENEKL			NHKINLTTT		
IALR113/96/I	...F...L...K.....			T...S.....GI.		E.....		N.....		TV.....				
IALR16/96/I	...F...L...K.....			T...S.....GI.		E.....		N.....		TV.....				
IALR23/96/I	...F...L...K.....			T...S.....GI.		E.....		N.....		TV.....				
IALR131/97/I	...S.....K.....			T...S.....G..		S.E.....		N.....		TV.....				
IALR137/97/I	...F...L...K.....			T...S.....GI.		E.....		N.....		TV.....				
IALR152/98/II	S...S.....			TA.A.....GI.		E.....		N.....		V.....			..Y.....		
IALR179/98/II	S...S.....			TA.A.....GI.		E.....		N.....		V.....			..Y.....		
IALR215/99/II	S...S.....			TT.A.....GI.		E.....		N.....		V.....			..Y.....		
IALR224/99/II	S...S.....			TA.A.....GI.		E.....		N.....		V.....			..Y.....		
IALR233/99/II	S...S.....			TA.A.....GI.		E.....		N.....		V.....			..Y.....		
IALR270/00/II	S...S.....			TA.A.....GI.		E.....		N.....		V.....			..Y.....		
IALR280/00/II	S...S.....			TA.A.....GI.		E.....		N.....		N.V.....			..Y.....		
IALR291/00/II	S...S.....			TA.A.....GI.		E.....		N.....		V.....			..Y.....		
IALR297/00/II	S...S.....			TA.A.....GI.		E.....		N.....		V.....			..Y.....		
IALR336/01/II	S...S.....			TA.A.....GI.		E.....		N.....		V.....			..Y.....		
IALR342/01/I	...S.....K.....			T...S.....G..			I.....S.E.....		N.....		TV.....				
IALR435/02/I	...S.....K.....			T...S.....G..			I.....S.E.....		N.....		TV.....				
IALR493/02/I	...S.....K.....			T...S.Y...G..			I.....S.E.....		N.....		TV.....				
IALR577/03/II	S...S.....I.....			TA.A.....GI.		E.....		N.....		V.....			..Y.....		
IALR581/03/II	S...S.....			TA.A.....GI.		E.....		N.....		V.....			..Y.....		
IALR627/03/II	S...S.....			TA.A.....GI.		E.....		N.....		V.....			..Y.....		
IALR777/04/II	S...F.....			TA.A.....GI.		E.....		N.....		V.....			..Y.....		
IALR784/04/II	S...F.....I.....			TA.A.....GI.			.D.....E.....		N.....		V.....				
IALR788/04/I	...F.....K.....			T...S.F...G..		S.E.....		N.....		TV.....				
IALRo50/04/I	...F.....K.....			T...S.F...G..		S.E.....		N.....		TV.....				
IALR795/04/I	...F.....K.....			T...S.F...G..		S.E.....		N.....		TV.....				
IALR796/04/II	S...S.....			TA.A.....GI.		E.....		N.....		V.....			..Y.....		
IALR799/04/I	...F.....K.....			T...S.F...G..		S.E.....		N.....		TV.....				
IALR1138/05/II	S...F.....I.....			TA.A.....GI.		E.....		N.....		V.....				
IALR1139/05/II	S...S.....			TA.A.....GI.		E.N.....		N.....		V.....			..SY.....		
IALR1158/05/II	S...F.....I.....			TA.A.....GI.		E.....		N.....		V.....				
IALR1159/05/II	S...F.....I.....			TA.A.....GI.		E.....		N.....		V.....				
IALR1182/05/II	S...F.....I.....			TA.A.....GI.		E.....		N.....		V.....				
IALR1202/05/I	...F.....K.....			T...S.F...G..		S.E.....		N.....		TV.....				
IALR1204/05/I	...F.....K.....			T...F.....GI.		S.E.....		N.....		TV.....				
IALR1616/06/I	...FI.....K.....			T...S...R...GI.		S.E.....		N.....		TV.....				
IALR1451/06/I	...F.....K.....I			T...S.....GI.		S.E.....		N.....		TV.....				
IALR1393/06/I	...F.....K.....I			T...S.....GI.		S.E.....		N.....		TV.....				

Figura 18. Comparação das regiões variáveis 3 a 5 (região A), 7 (região B), 8 (região C) e 9 (região F) das seqüências de aminoácidos dos rotavírus (VP7) G1 do Estado de São Paulo e amostra de referência Wa.*Lin: Linhagem.

Tabela 9 - Alterações observadas nas regiões variáveis VR4 das amostras de rotavírus linhagens VP7 G1.

Série	Ano/Mes	Amostra	Linhagem	Posição assinatura 65, 66, 68 Região VR4
1	96_08	IALR16	I	TV-S
2	96_08	IALR23	I	TV-S
3	96_06	IALR113	I	TV-S
4	97_09	IALR131	I	TV-S
5	97_09	IALR137	I	TV-S
6	98_04	IALR152	II	TA-A
7	98_08	IALR179	II	TA-A
8	99_06	IALR215	II	TT-A
9	99_06	IALR224	II	TA-A
10	99_06	IALR233	II	TA-A
11	00_03	IALR270	II	TA-A
12	00_06	IALR280	II	TA-A
13	00_06	IALR291	II	TA-A
14	00_06	IALR297	II	TA-A
15	01_04	IALR336	II	TA-A
16	01_06	R342	I	TV-S
17	02_06	IALR435	I	TV-S
18	02_09	IALR493	I	TV-S
19	03_08	IALR577	II	TA-A
20	03_08	IALR581	II	TA-A
21	03_09	IALR627	II	TA-A
22	04_05	IALR777	II	TA-A
23	04_05	IALR784	II	TA-A
24	04_05	IALR788	I	TV-S
25	04_06	IALRO50	I	TV-S
26	04_06	IALR795	I	TV-S
27	04_06	IALR796	II	TA-A
28	04_06	IALR799	I	TV-S
29	05_06	IALR1138	II	TA-A
30	05_06	IALR1139	II	TA-A
31	05_07	IALR1158	II	TA-A
32	05_07	IALR1159	II	TA-A
33	05_08	IALR1202	I	TV-S
34	05_08	IALR1182	II	TA-A
35	05_09	IALR1204	I	TV-F
36	06_06	IALR1393	I	TV-S
37	06_08	IALR1451	I	TV-S
38	06_08	IALR1616	I	TV-S

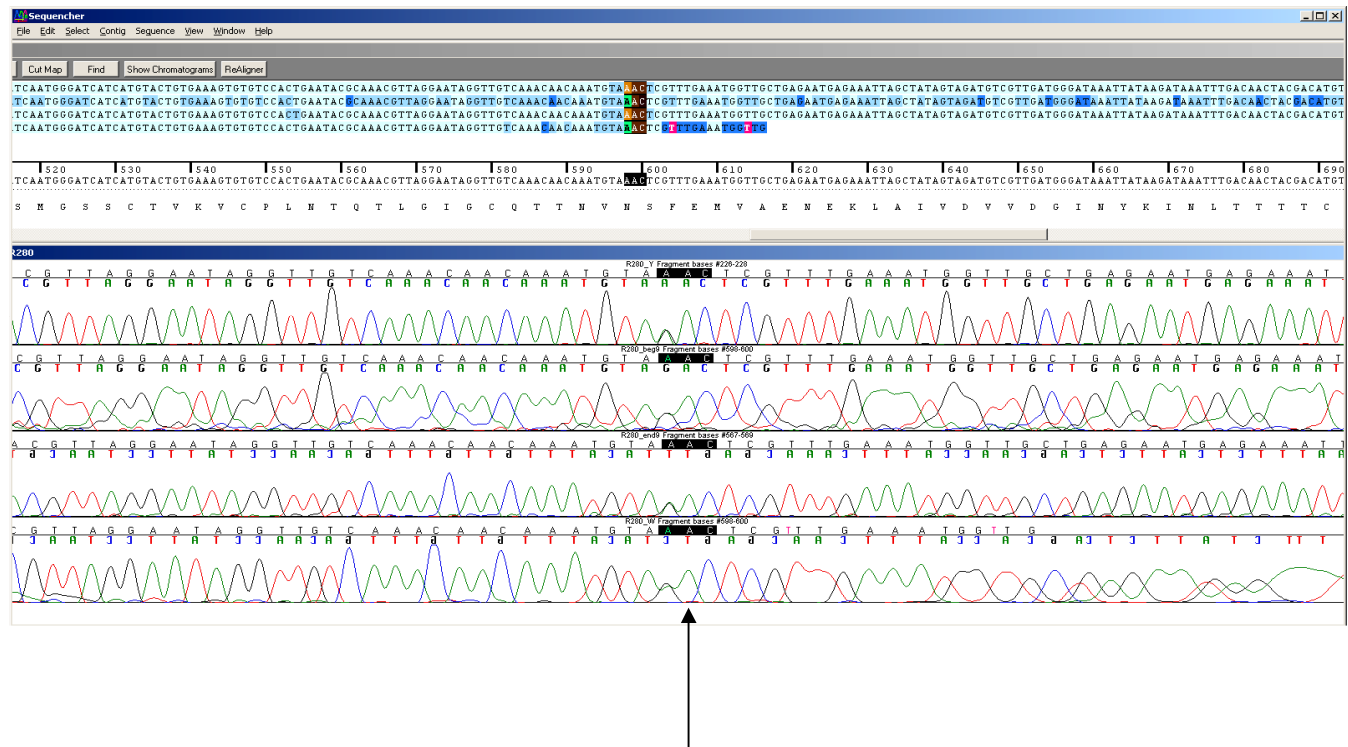


Figura 19. Eletroferograma parcial da sequência da amostra de RV IALR280 (mudança de aa D213N), obtida no sequenciador automático ABI Prism 3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems, Inc.

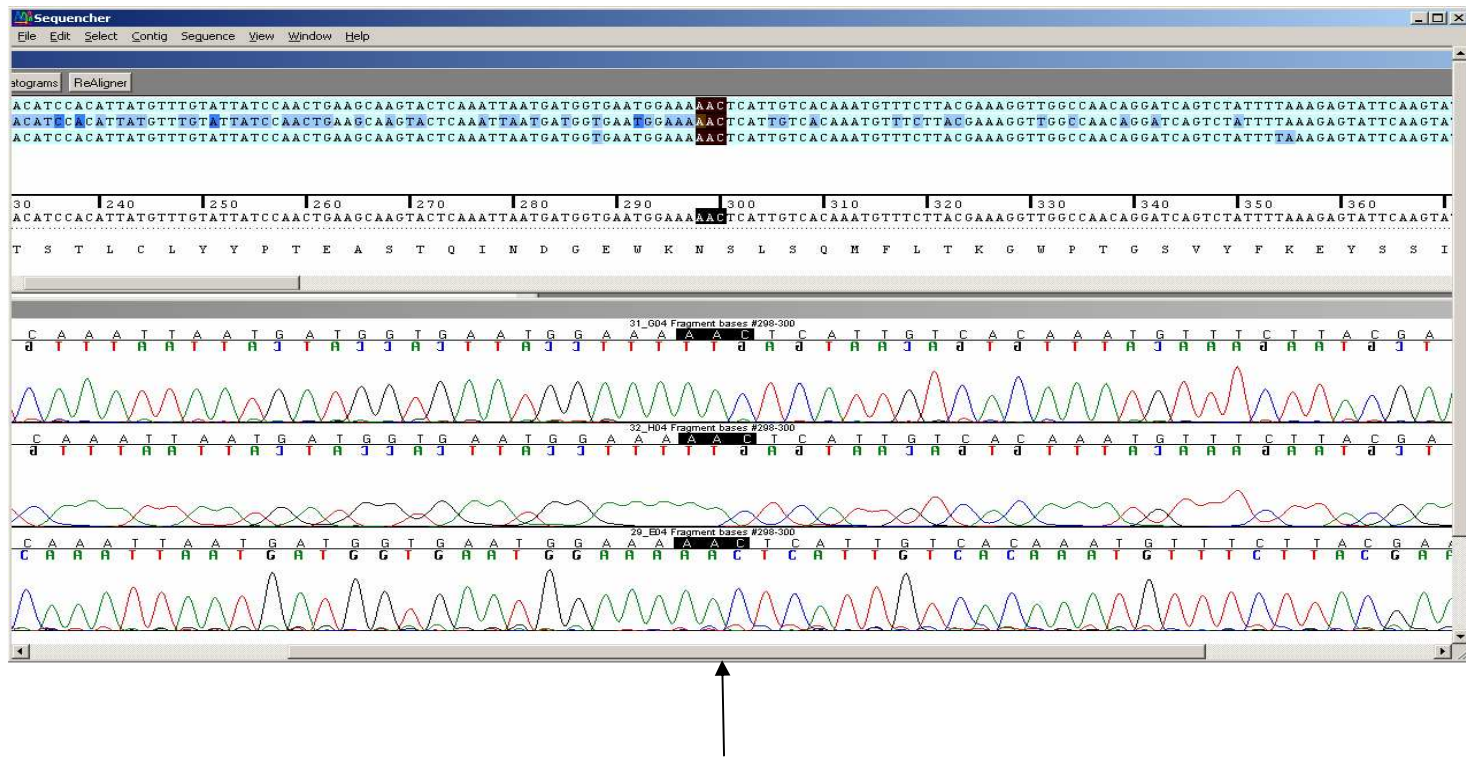


Figura 20. Eletroferograma parcial da sequência da amostra de RV IALR1139 (mudança de aa D100N), obtida no sequenciador automático ABI Prism 3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems, Inc.

5 DISCUSSÃO

5.1 DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS

As doenças diarréicas são consideradas em todo o mundo a segunda causa de morte em crianças menores de 5 anos, com cerca de 2,0 milhões de óbitos a cada ano, e destes, aproximadamente 600 mil atribuíveis ao rotavírus (PARASHAR, 2006). Além disso, estima-se que 40% dos casos internados por diarréia grave são devido ao rotavírus. Embora os casos se concentrem em países em desenvolvimento, o vírus se distribui mundialmente, infectando crianças e adultos de distintas classes sociais.

Atualmente os estudos de epidemiologia molecular dos RVs-A são primordiais para se determinar a distribuição dos sorotipos/genótipos do vírus e sua diversidade na população, e as informações obtidas permitem acompanhar a eficácia de vacinas introduzidas para a prevenção da doença e monitorar a evolução dos rotavírus.

No presente trabalho foi analisada a frequência dos RVs-A em 8.961 amostras de pacientes com quadro de diarréia aguda que procuraram atendimento médico, nas diversas unidades de Serviço Público de Saúde do Estado de São Paulo, durante onze anos de vigilância.

A amostragem retrospectiva de conveniência utilizada no estudo tornou factível a execução desta pesquisa para nossa realidade. Apesar da possibilidade desta amostragem não representar o cenário epidemiológico real da população, o significado dos resultados obtidos servirão de subsídios na elaboração de estratégias específicas de controle da doença, e acompanhamento de futuras campanhas de imunização contra rotavírus, voltados à nossa realidade.

A caracterização dos genótipos G e P dos RVs-A em pacientes com diarréia aguda, principalmente em crianças menores de cinco anos de idade teve como

finalidade contribuir para os conhecimentos relacionados aos aspectos moleculares e epidemiológicos.

Entre 1996 e 2006, antes da introdução da vacina contra rotavírus no calendário de imunização nacional, a média na frequência de RVs-A detectada no estudo foi de 20% entre as amostras analisadas. Na tabela 2 pode-se verificar a variação de 11,2% a 31,8% na frequência de positividade dos rotavírus no período.

Os primeiros estudos sobre a distribuição dos rotavírus no quadro de diarreia aguda, realizados nas diversas regiões do Brasil, demonstram variação na percentagem de positividade em 12% a 42% (LINHARES, 2000).

Podemos verificar em alguns estudos realizados na região do Estado de São Paulo, que a frequência dos rotavírus variou em diferentes períodos e grupos analisados. Em um estudo caso-controle realizado em crianças menores de cinco anos de idade, no Município de São Paulo, Carmona et al. (2004) relataram positividade dos RVs-A em 36,7% das crianças hospitalizadas com diarreia aguda, 22,0% das crianças com diarreia aguda atendidas em ambulatório e 1,7% em crianças sem quadro sintomático.

Souza et al. (2002) determinaram o perfil etiológico das diarreias agudas de um grupo de crianças menores de 5 anos de idade, atendido em um serviço regional de pronto-atendimento pediátrico, no Município de São Paulo. Este grupo foi dividido em 154 crianças com diarreia aguda e 42 sem diarreia aguda. O RV-A foi detectado apenas no grupo de crianças com diarreia aguda, ou seja, em 20,8% das amostras analisadas.

Munford et al. (2007) verificaram a presença dos RVs-A em amostras de crianças com diarreia aguda atendidas no ambulatório do Hospital Universitário (HU) - Universidade de São Paulo, SP, no período de 1994 a 1996. De um total de 157

amostras analisada, 34,4% foram positivas para RV-A.

Martini et al. (2008) relataram a ocorrência de dois surtos de diarreia por RVs-A no Município de Campinas, SP, em setembro de 2003 e agosto de 2004. Os autores detectaram 29,3% dos RVs-A em 328 amostras de fezes analisadas por PAGE e RT-PCR.

Carraro et al. (2008) também descreveram a presença do RV-A em 20% das amostras de fezes analisadas de crianças e adultos com quadro de diarreia aguda, pertencentes a alto nível sócio econômico, atendidos no Hospital Albert Einstein, São Paulo, entre os anos de 2003 e 2005. Os autores observaram a distribuição temporal dos RVs em 19,8% no ano de 2003; 21,7% em 2004; e 18,7% em 2005. A presença de rotavírus nos anos de 2004 e 2005 foi similar aos observados no presente estudo.

Para determinar a incidência das diarreias por rotavírus e conhecer seu impacto na população do Estado de São Paulo, o CVE/SP em conjunto com Instituto Adolfo Lutz e outras entidades, desenvolveram um estudo sobre a participação dos rotavírus nos casos de diarreia aguda. Foram analisadas crianças menores de cinco anos de idade, provenientes dos municípios de Rio Claro, interior do Estado de São Paulo e Guarulhos, na Grande São Paulo, no período de 2004 a 2005. Os resultados mostraram que as diarreias por rotavírus representaram entre 6,5 a 17,9% em Rio Claro e Guarulhos, respectivamente (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO, 2009).

Entre os anos de 2005 e 2006 Munford et al. (2009) analisaram a frequência dos RVs-A em crianças hospitalizadas com quadro de diarreia aguda e/ou atendidas em ambulatório, no Município de São Paulo. Os autores descreveram a ocorrência de rotavírus em 53,6% das amostras testadas.

Morillo et al. (2010) demonstraram que a infecção por rotavírus foi detectada, durante período de 2004 a 2008, em 28,3% (38/134) das amostras analisadas de crianças < 5 anos de creche que apresentaram diarreia aguda, provenientes do Estado de São Paulo.

Estudos também realizados em outros estados da região Sudeste demonstram a diversidade na percentagem de positividade para rotavírus em pacientes com quadro de diarreia aguda.

No Estado do Rio de Janeiro Santos et al. (2003), entre 1997 e 1999, detectaram a presença de rotavírus em 23% das amostras de fezes analisadas de crianças menores de cinco anos de idade.

Volotão et al. (2006) observaram apenas 8,2% de positividade de rotavírus em 1.568 amostras analisadas, durante vigilância conduzida das diarreias agudas em crianças na cidade do Rio de Janeiro, entre os anos de 2000 e 2004.

No período de 2002 a 2006, ainda na cidade do Rio de Janeiro foi observada a ocorrência de rotavírus em 50% das 193 amostras de crianças hospitalizadas com quadro de diarreia grave (GOUVEA et al., 2007).

Em trabalhos realizados nas demais cidades da região Sudeste, como Espírito Santo e Minas Gerais, a positividade de rotavírus esteve entre 20,5% a 29,2% (NUNES et al., 2009; RIBEIRO et al., 2008; ROSA-SILVA et al., 2001).

Poucos estudos sobre a ocorrência dos rotavírus têm sido realizados na região sul do País. Em Ponta Grossa, Paraná, Pietruchinski et al. (2006) descreveram a prevalência do vírus em 28,3% das amostras de fezes de crianças e adultos que apresentavam quadro de diarreia aguda, entre maio e agosto de 2003. Munford et al., (2009) descreveram entre os anos de 2005 e 2006 a ocorrência de 21,4% de RVs-A em

crianças com quadro de diarreia aguda, provenientes da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Estudos realizados nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte também têm relatado a positividade dos RVs-A na população.

Na cidade de Goiânia, Goiás, região Centro-Oeste do país, a ocorrência dos rotavírus variou de 10,7% a 41,8% dos casos de crianças com quadro diarreia aguda em estudos realizados no período de 1986 a 2005 (CARDOSO et al., 2003; SOUZA et al., 2003; COSTA et al., 2004; MUNFORD et al., 2009).

Nas cidades dos estados da Bahia (Salvador), Maranhão (São Luís) e Pernambuco (Recife), região nordeste, a positividade dos rotavírus tem sido descrita entre 32% e 38,1% (SANTOS et al., 2005; LUZ et al., 2005; MONTENEGRO et al., 2007; MUNFORD et al., 2009).

Em Belém do Pará, região norte do país, estudos têm relatado a participação dos RVs-A em média de 36,5% dos pacientes analisados com diarreia aguda (LINHARES et al., 2000).

Os estudos acima descritos relatam a variação da percentagem dos RVs nas diarreias agudas conforme a região, período e grupo analisados.

Grande variedade na percentagem de detecção de RVs também tem sido observada em outros estudos conduzidos na América do Sul. Nestes estudos os RVs foram detectados entre 20% e 71% das amostras de crianças hospitalizadas com diarreia aguda e 9% a 39% em crianças atendidas em ambulatório. Esta variedade na frequência pode ser devido a diferenças de idade na população estudada, a qual incluía crianças menores de dois anos de idade no Peru (GOMES et al., 1998), menores de três anos na Argentina, Chile e Venezuela (O'RYAN et al., 2001) e crianças menores de

5 anos na Venezuela (SALINAS et al., 2004).

5.2 SAZONALIDADE

Em relação à distribuição das diarreias por rotavírus, na figura 7 observamos que os rotavírus foram detectados ao longo do período estudado, porém com maior incidência nos meses mais secos, junho a setembro, decaindo nos meses subsequentes.

A variação temporal dos rotavírus é bem definida nos países de clima temperado, sendo frequentes nos meses mais frios (COOK et al., 1990).

No Brasil, Pereira et al. (1993) observaram que as rotavirose ocorreram com maior incidência nos meses mais frios e secos nas regiões sul, sudeste e centro-oeste. Nas regiões norte e nordeste o rotavírus ocorreu ao longo do ano e de forma homogênea. Porém, durante vigilância intensiva dos casos diarreicos realizada por Linhares et al. (1996) observou-se a predominância dos RVs nos meses mais secos do ano.

5.3 FAIXA ETÁRIA

A diarreia por rotavírus ocorre tanto em neonatos quanto em crianças, e em indivíduos com idades mais avançadas (LINHARES, 2000).

No presente trabalho, a ampla maioria dos casos rotavírus-positivo foi detectada em crianças menores de 24 meses de idade (69,4%), e o pico de incidência ocorreu na faixa etária de 7 a 12 meses (CARMONA et al., 2006).

Resultados similares foram descritos por Munford et al. (2007), os autores observaram maior percentagem de positividade para rotavírus em crianças com diarreia

na faixa etária de 7 a 12 meses de idade (37,1%), atendidas no Hospital Universitário, SP.

Entretanto estudo realizado por Munford et al. (2009), no período de 2005 a 2006, em 4 diferentes cidades de regiões distintas no Brasil, demonstram variedade na distribuição dos rotavírus em diferentes faixas etárias. Em Goiânia e São Paulo, a maioria das crianças com diarreia aguda analisada apresentava idade inferior a 2 de anos, e a alta frequência de amostras positivas foi encontrada entre 13 e 24 meses (60,0%), e 7 e 12 meses de idade (67,5%), respectivamente. Em Porto Alegre e Salvador a frequência maior de amostras positivas foi em crianças > 24 meses e < 6 meses de idade, respectivamente, que apresentavam quadro diarreia aguda.

Outros estudos realizados em diversas regiões do Brasil demonstram que pelo menos 2/3 dos processos de diarreia por rotavírus se encontram na faixa etária de 6 a 24 meses (LINHARES, 2000).

Em estudo realizado na Argentina, entre 1996 e 1998, os autores também observaram a predominância dos rotavírus em crianças até 12 meses de idade (BOK et al, 2001). Porém, no Paraguai a percentagem maior de rotavírus nos casos de diarreia aguda foi detectada em crianças entre 12 e 23 meses de idade (COLUCHI et al., 2002). Este resultado também foi observado por Yoshinaga et al. (2006), que observaram maior frequência das diarreias por rotavírus no Japão em crianças com quadro de diarreia aguda.

As variações observadas nas faixas etárias das diarreias por rotavírus podem ser explicadas conforme os fatores específicos de cada região analisada (PARASHAR; BRESEE; GLASS, 2003). Entretanto, a ampla maioria dos estudos indica que a faixa etária mais susceptível se encontra entre 7 a 12 meses (LINHARES et al., 2000; KANE

et al., 2004; BRESEE et al., 2005).

No presente trabalho, o rotavírus foi detectado com menor frequência em adultos e idosos (7,8%). O achado de baixa percentagem de infecção por rotavírus entre os adultos se deve ao fato da doença ser considerada uma infecção típica da infância (FISCHER et al., 2005).

Diferenças de resultados foram observados quando comparado ao estudo realizado por Pietruchinski et al. (2006). Os autores demonstraram que os rotavírus estiveram presentes em 11,3% das amostras analisadas entre adultos e idosos (8/71), no estado do Paraná, em 2003. Resultados inesperados de alta positividade também foram observados quando a idade foi estratificada entre 6 e 14 anos e entre 15 e 72 anos de idade com 17,7% (8/45) e 29,6% (8/27), respectivamente.

Estudos epidemiológicos mostram que as infecções por RVs-A em adultos são usualmente subclínicas, mas ocasionalmente causam doença entre os familiares próximos das crianças com infecção por rotavírus, em pacientes imunocomprometidos e em idosos. Contextos epidemiológicos comuns para a infecção por rotavírus em adultos incluem a doença endêmica, surto epidêmico, infecções relacionadas a viagens e transmissão de criança para adulto (ANDERSON e WEBER, 2004).

Surtos de diarreia por rotavírus entre crianças jovens, adultos e idosos têm sido descritos em diversos países, tanto em comunidades fechadas como na população em geral, e muitas vezes acometendo de forma grave no grupo de idosos (TIMENETSKY et al., 1996; EDMONSON; EBBERT; EVANS, 2000; DEL REFUGIO GONZALES-LOSA et al., 2001; RUBILAR ABREU et al., 2005; WANG et al., 2007; PODKOLZIN et al., 2009; TATTE; GENTSCH; CHITAMBAR, 2010).

5.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

A caracterização molecular dos RVs-A em genótipos G (VP7) e P (VP4) tem sido amplamente realizada em todo mundo. Estas informações são primordiais para determinar a prevalência e a distribuição dos genótipos de rotavírus na população, servindo de subsídios na orientação de estratégias para o desenvolvimento de vacinas eficientes.

No presente trabalho, a caracterização das amostras de rotavírus em genótipos G e P permitiu ampliar o conhecimento sobre a epidemiologia desses vírus no nosso meio.

5.4.1 Genótipo G (VP7)

Em nosso estudo de onze anos de vigilância, o genótipo G1 foi o mais frequente entre as amostras selecionadas para genotipagem, com percentual de 35,2%. O genótipo G1 foi predominante nos seis primeiros anos analisados, entre 1996 e 2001 e depois em 2003 (CARMONA et al., 2006).

O genótipo G1 é considerado o tipo mais prevalente universalmente, ocorrendo em mais de 60% das infecções por rotavírus (CASTELLO et al., 2004; SANTOS e HOSHINO, 2005).

No Brasil, a prevalência do genótipo G1 tem sido descrita por vários autores. Pereira et al. (1993), através de uma coletânea de dados envolvendo 14 estados brasileiros, demonstraram a predominância do genótipo G1 em 27%, e em seguida do tipo G2.

Castro et al. (1994) identificaram o sorotipo G1 como causa de um surto ocorrido em uma creche na cidade do Rio de Janeiro. Leite et al. (1996), em estudo realizado

com amostras de pacientes provenientes de nove estados brasileiros e Distrito Federal verificou-se a predominância do genótipo G1 entre os anos de 1982 e 1994. Santos et al. (1998; 2003) e Volotão et al. (2005) demonstraram no Rio de Janeiro a predominância do tipo G1 entre 1996 e 2004.

Em Minas Gerais o genótipo G1 foi o mais prevalente entre os anos de 2005 e 2007 (NUNES et al., 2009).

Em Goiás, nos períodos de 1986 a 1995 e 2000 a 2003 observou-se da mesma forma o maior predomínio do G1 entre as amostras de RVs analisadas (CARDOSO et al., 2001; SOUZA et al., 2003; COSTA et al., 2004).

Pietruchinski et al. (2006) demonstraram em 2003 na cidade de Ponta Grossa, Paraná o maior predomínio do G1 (91,8%) entre crianças e adultos com quadro de diarreia aguda, depois os tipos G9 (3,3%) e G12 (1,6%).

Munford et al. (2009) observaram o predomínio do tipo G1 em 75% das amostras de crianças com diarreia aguda, em Porto Alegre, RS, no período de 2004 a 2006

Em Belém, Pará a predominância do sorotipo G1 em crianças com diarreia aguda tem sido descrita em diversos estudos (LINHARES et al., 1988; MASCARENHAS et al., 2002).

Em Terezina, Piauí, Macedo et al. (2007) descreveram o predomínio do tipo G1 com percentagem de 25,2% entre as amostras de RVs analisadas no período de 1994 a 1996.

No estado de São Paulo, Timenetsky; Santos; Gouvea (1994), analisando a distribuição temporal dos diferentes genótipos de rotavírus durante o período de 1986 a 1992, observaram a predominância do G1 no ano de 1987. Em estudo realizado na cidade de São Paulo, Carmona et al. (2004) descreveram a ocorrência dos genótipos G1 em

55%, G2 (5,5%), G3 (5,5%) e G5 (16,7%) das amostras de RVs analisadas, no grupo de crianças com diarreia aguda hospitalizadas. Neste estudo foi possível observar uma tendência entre o genótipo G1 e a gravidade da doença. No grupo de crianças atendidas em nível ambulatorial a percentagem dos genótipos G1, G2 e G3 foi de 2,0% cada, neste grupo o tipo G5 foi o mais frequente. Munford et al. (2007) demonstraram no período analisado de março de 1994 a fevereiro de 1996 o predomínio do genótipo G2 em 59,3% das amostras de RVs testadas e o tipo G1 em 33,3%.

A elevada frequência dos genótipos G2, G3, G4 e G9 é descrita da mesma forma em todo mundo. Estes genótipos, associados do tipo G1 correspondem a mais de 80% das infecções por rotavírus (CASTELLO et al., 2004; SANTOS e HOSHINO, 2005).

No presente trabalho, o genótipo G9 foi o segundo mais frequente com 31,2% das amostras de RVs analisadas, depois os tipos G2 (4,0%), G3 (3,5%), G4 (2,2%) e G12 (0,5%), este último tipo pela primeira vez detectado no Estado de São Paulo. Foi possível observar a emergência do genótipo G9 a partir do ano 2000, e o seu predomínio em relação aos outros tipos nos anos de 2002 (CARMONA et al. 2006), 2004 e 2005.

O genótipo G9 foi descrito pela primeira vez por Clark et al. (1987) em amostras de fezes de crianças com diarreia aguda na Filadélfia, EUA. Em seguida ficou por uma década sem relatos de sua detecção, e então re-emergiu na década de 90 na mesma cidade, com frequência de 50% das amostras de RVs analisadas (CLARK et al., 2004).

No Brasil, a emergência do genótipo G9 foi descrita em 1997 por Araujo et al. (2001) e Santos et al. (2001) em amostras de fezes de crianças com diarreia aguda vez, no Rio de Janeiro.

A alta frequência do genótipo G9 foi observada em estudo realizado por Santos

et al. (2003) em amostras de fezes de crianças menores de cinco anos de idade com quadro de diarreia aguda, no período de 1997 a 1999, nas cidades de Niterói e Rio de Janeiro. Os autores identificaram apenas uma amostra genótipo G9 (1,5%) em 1997, e nos anos subsequentes houve um aumento significativo para 2,5% em 1998 e 27,7% em 1999, incluindo as infecções mistas por G9. Entre os anos de 1997 e 1998, Araujo et al. (2001) também descreveram no Rio de Janeiro, a ocorrência do genótipo G9 em 13% das amostras analisadas.

Montenegro et al. (2007) descreveram em estudo conduzido em Recife, PE, a participação do genótipo G9 (29%) como o segundo mais frequente entre as amostras de RVs analisadas de crianças com diarreia aguda, no período de Maio de 2004 a Abril de 2005

Em Goiânia, GO, Souza et al. (2003) descreveram a ocorrência do genótipo G9 entre os anos de 1998 e 2000, como o terceiro tipo mais prevalente. Nos anos de 2000 a 2002 foi o segundo mais prevalente (COSTA et al., 2004).

O predomínio do genótipo G9 foi observado em diversos estudos conduzidos no Brasil (SANTOS et al., 2005; CARMONA et al., 2006; GOUVEA et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008; MUNFORD et al., 2009; CARVALHO-COSTA et al. 2009).

Santos et al. (2005) em estudo realizado em Salvador, Bahia, demonstraram o predomínio do genótipo G9 durante os três anos de estudo. Os autores identificaram nas amostras analisadas o tipo G9 em 89,2% no ano de 1999; 85,3% em 2000 e 74,5% em 2002, corroborando com os dados do presente estudo quando comparado ao ano de 2002.

Em estudo clínico com a vacina RIX4414 (Rotarix) realizado em Belém constatou-se a ampla predominância do genótipo G9 em 64% das amostras

(LINHARES et al., 2006a). Neste estudo, a infecção pelo genótipo G9 foi associada aos casos de maior gravidade, se comparada com tipo G1 (LINHARES et al., 2006b).

Gouvêa et al. (2007) descreveram o predomínio do genótipo G9 em 66% das amostras analisadas, no período de 2002 a 2006, na cidade do Rio de Janeiro, RJ. Ainda na cidade do Rio de Janeiro, em 2005 Carvalho-Costa et al. (2009) descreveram o predomínio do G9 em 45% das amostras de RVs analisadas.

Na cidade de Vitória, ES, Ribeiro et al. (2008) relataram o predomínio do genótipo P[8]G9 em 50% das amostras analisadas de crianças hospitalizadas por diarreia aguda, em 2004 a 2006.

Munford et al. (2009) realizando estudo em 4 cidades de regiões distintas no Brasil, no período de 2005 a 2006, observaram a predominância do genótipo G9 apenas no Estado de São Paulo, em 83% das amostras analisadas, entretanto em Goiânia e Salvador o tipo predominante foi G2 e em Porto Alegre o tipo G1.

A presença e ou predomínio do tipo G9 de RV também podem ser observados em diversos países do continente (SANTOS e HOSHINO, 2005). No continente asiático, o predomínio do tipo G9 foi observado no Japão nos anos de 1998 a 1999, com percentagem de 52,9% e 71,4%, respectivamente. Na Austrália, o genótipo foi detectado pela primeira vez em 1997, sendo nos anos de 1999 a 2000 o segundo mais prevalente, e nos anos de 2001 a 2002 o de maior relevância (MASENDY CZ et al., 2000, 2001; KIRKWOOD et al., 2002). No Continente africano, o G9 tem sido relatado na Índia e África desde 1993 e 1997, respectivamente. No continente Europeu, tem sido descrito desde 1990 no Reino Unido, e nos anos seguintes na Itália, França, Hungria e Espanha (SANTOS e HOSHINO, 2005).

Na América Latina, o genótipo G9 tem sido detectado desde 1996 na Argentina,

Colômbia desde 1998, Paraguai desde 1999 e Equador desde 2005. Estudos realizados em alguns países da América do Sul corroboram com os dados do nosso estudo em relação o predomínio do RV G9 conforme o período. Parra et al. (2007) descreveram o predomínio do tipo G9 nos anos de 2004 (80,6%) e 2005 (44,9%). No Equador, o G9 foi predominante nos ano de 2005 (79%) e em 2006 (28%) (HASING et al., 2009). O predomínio de G9 também foi observado na Argentina, em estudo conduzido por Esteban et al. (2010), em 58,0% e 61,5% das amostras de RVs analisadas, nos anos de 2005 e 2006, respectivamente. No nosso estudo, em 2006 o genótipo G2 foi o predominante entre as amostras de RVs genotipadas.

Linhares et al. (2006b) analisando os estudos clínicos têm associado o RV G9 à gravidade da doença

A emergência do genótipo G9 no Brasil coincidiu com a diminuição do tipo G5, este último considerado no nosso meio de importância epidemiológica (SANTOS et al., 2003).

No presente trabalho, o genótipo G5 não foi detectado entre as amostras de RVs caracterizadas desde 1996 (CARMONA et al., 2006). Entretanto, nossos dados diferem do estudo realizado por Martini et al. (2008). Os autores relataram a presença do genótipo G5 nas amostras analisadas, na cidade de Campinas, entre os anos de 2003 e 2004 em 9,1% e 8,9%, respectivamente. O sorotipo G5, encontrado predominantemente em suínos e ocasionalmente em eqüinos, foi detectado em humanos pela primeira vez na década de 80 em amostras de crianças brasileiras, considerados de grande importância epidemiológica devido ao seu predomínio durante os estudos realizados (GOUVEA et al., 1994a; TIMENETSKY et al., 1997; LEITE et al., 1996).

Os genótipos G1, G2, G3 e G4 estão frequentemente relacionados às infecções em humanos e são considerados os mais prevalentes mundialmente (SANTOS e HOSHINO, 2005). Entre as amostras genotipadas no presente trabalho, os tipos G2, G3 e G4 corresponderam a apenas 10,4% das amostras analisadas, incluindo as misturas entre os diversos tipos de RVs. Estes apresentaram variação na distribuição ao longo do período estudado. Os genótipos G1, G2, G3 e G4 corresponderam a 57,2% das infecções causadas por RVs no nosso estudo, e quando consideramos o tipo G9 corresponderam a 97% das infecções. O que demonstra a importância do tipo G9 no nosso meio.

Por outro lado foi possível observar no nosso estudo, o predomínio do genótipo G2 entre os tipos G rotavírus no ano de 2006, coincidindo com a introdução da vacina contra rotavírus (P[8]G1 - Rotarix[®] GlaxoSmithKline Biologicals). Esta tendência tem sido observada em diversos estudos realizados no Brasil.

Gurgel et al. (2007) observaram na cidade de Aracaju, Sergipe, que crianças anteriormente vacinadas com a vacina Rotarix[®] foram infectadas pelo RV-A, genótipo P[4]G2. Foi considerada a hipótese de esta mudança estar associada à introdução da vacina contra RV-A no Brasil, conforme sugerem Nakagomi et al. (2008). Porém este achado estaria mais associado à variabilidade temporal da distribuição de genótipos, verificada na re-emergência do RV G2 em outros estados brasileiros (CARVALHO-COSTA et al., 2009; LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES, 2008; RIBEIRO et al., 2008; CARMONA et al., 2006; 2009; GURGEL et al., 2009; MUNFORD et al., 2009; CORREIA et al., 2010; MASCARENHAS et al., 2010). Estudos indicam que a periodicidade temporal do tipo G2 apresenta um padrão cíclico de aproximadamente 10 anos (CARVALHO-COSTA et al., 2009).

Recentemente, estudos desenvolvidos em outros países também têm demonstrado a re-emergência e predomínio do genótipo P[4]G2 (SANTOS & HOSHINO, 2005; PARRA et al., 2007; ESPINOLA et al., 2008; KIRKWOOD et al., 2009; ESTEBAN et al., 2010; HASING et al. 2009). Muitos autores afirmam que o sorotipo G2 está associado aos quadros mais graves da doença, ocorrendo em períodos cíclicos, de curta duração e geralmente de forma epidêmica (BERN et al., 1992; TABASSUM; SHEARS; HART, 1994).

No estado de São Paulo, após a introdução da vacina contra rotavírus, Carmona et al. (2009) observaram no período de Janeiro de 2007 a Agosto de 2009, o predomínio do tipo P[4]G2 (62,0%), seguidos de P[8]G1 (1,8%) e P[8]G3 (1,8%). O G2 foi único genótipo identificado em 2007. Os autores em análise preliminar observaram a queda abrupta nos casos de gastroenterite por rotavírus durante o período 2008-2009, com taxas de redução de 13,5% para 3,0%.

A vacina utilizada contra o RV-A, incluída no Brasil e em outros países da América Latina e Europa, é o Rotarix® (P[8]G1). A vacina é aplicada nas idades de 2 meses (1ª. dose) e 4 meses (2ª. dose). A eficácia da vacina Rotarix®, segundo alguns estudos com lactentes de 6 a 13 semanas de idade, de 11 países da América Latina, incluindo o Brasil (Belém/PA), para a prevenção de diarreia grave foi de 84,7% e 85% para hospitalização. A eficácia para prevenção de diarreia grave para todos os sorotipos do grupo G foi de 91,8%, para sorotipos P[8]G3, P[8]G4P e P[8]G9P foi de 87,3% e para o sorotipo P[4]G2P foi de 41,0%. A proteção teve início cerca de duas semanas após a segunda dose. Em outros países, como nos Estados Unidos, é utilizada a vacina oral atenuada pentavalente, com rearranjo humano-bovino, G1, G2, G3, G4 e P[8](Rotateq®, Merck) (Referencias Rotarix e Rotateq).

A queda nas doenças diarréicas graves que levam a hospitalização após a introdução das vacinas contra RVs tem sido observada no Brasil e inclusive em outros países (CARVALHO-COSTA et al., 2009; CORREIA et al., 2010; CURNS et al., 2010; ESPARZA-AGUILAR et al., 2009; GURGEL et al., 2009; LANZIERI et al., 2010; MUNOS et al., 2010; CHANG et al., 2010; PAULKE-KORINEK et al., 2010; RICHARDSON et al., 2010).

Entretanto para avaliar o real impacto da implantação da vacina contra RVs na morbidade da doença no Brasil, se faz necessário aprimorar a vigilância em hospitais e suporte laboratorial, que associado aos sistemas de vigilância rotineiros, permite conhecer a incidência do agente entre os casos menores de 5 anos internados por doença diarréica. Vigilância sentinela em hospitais para monitoramento da doença pós-vacina vem sendo conduzida em vários países por meio do Programa de Vacina de Rotavírus, uma colaboração entre a Organização Mundial de Saúde (OMS) e outras entidades na área de vigilância e programas de vacinação (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2009).

Os demais genótipos como G3 e G4 observados no presente estudo, da mesma maneira tem sido descritos em diversas regiões do mundo (CASTELLO et al., 2004; SANTOS e HOSHINO, 2005; LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES, 2008; GURGEL et al., 2008).

Em nosso estudo, o genótipo G12 foi detectado pela primeira vez no Estado de São Paulo, em 7 pacientes provenientes do município de Guarulhos, com características sócio-econômicas menos favorecidas. Este genótipo foi descrito pela primeira vez no Brasil no ano de 2003, na cidade de Ponta Grossa, Paraná, em amostra de uma criança com diarréia aguda (PIETRUCHINSKI et al., 2006). A importância deste

genótipo no nosso meio ainda é desconhecida.

O genótipo G12 também tem sido descrito de forma esporádica em outros países da América do Norte, América do Sul, Ásia e Europa (CASTELLO et al., 2009; PIETSCH e LIEBERT, 2009; HOSHINO e KAPIKIAN, 2005; CASTELLO et al., 2004).

Durante o período analisado no presente estudo, verificamos apenas 1,8% de mistura de genótipos G entre as amostras analisadas, com as seguintes misturas: G1+G9, G1+G2, G2+G3, G2+G9, G3+G9 e G4+G9. A detecção de infecções múltiplas com amostras de diferentes rotavírus humanos, como os tipos identificados neste estudo, demonstra potencial para a ocorrência de *reassortants* durante infecções naturais entre os vírus (NAKAGOMI e NAKAGOMI, 1993). Infecções mistas também têm sido descritas em diversas regiões do Brasil (LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES, 2008). Nossos resultados em relação à infecção mista se assemelham aos descritos em países desenvolvidos, com frequência menor de 4,0% (GENTSCH et al., 2005)

As misturas de RVs tanto G como P têm sido observadas com elevada frequência em outros países como Índia e Bangladesh, que apresentam condições sócio-econômicas menos favorecidas (GENTSCH et al., 2005).

5.4.2 Genótipos P (VP4)

Em relação ao genótipo P (VP4), o tipo P[8] foi o mais frequente com percentagem de 48% das amostras de RVs analisadas, o tipo P[4] (5,8%) P[6] (1,6%), P[9] (0,6%), P[10] (0,4%), P[3] (0,3%) e infecção mista (1,0%).

Diversos estudos descrevem a prevalência dos tipos P[8], P[4] e P[6] entre amostras de Rvs analisadas, e o encontro de P[9] (CASTELLO et al., 2004; SANTOS e

HOSHINO, 2005; SANTOS et al., 2001, 2002; GURGEL et al., 2008; LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES, 2008).

O encontro dos genótipos P[3] e P[10] neste estudo é considerado um evento raro, estes estiveram em associação com tipo G9. Poucos trabalhos têm descritos a ocorrência destes tipos, o P[3] foi descrito em infecções humanas na Ásia e America do Norte e o P[10] descritos na África (SANTOS e HOSHINO et al., 2005).

No presente trabalho, elevada percentagem de RVs G (21,6%) e/ou P (42,5%) não pode ser caracterizada por RT-PCR. Ocorrência de amostras de RVs-A não tipadas também tem sido relatada em diversos estudos, utilizando diferentes metodologias. Este fato deve ocorrer devido a mutações genéticas pontuais (*drift*), rearranjo genômico (*shift*) e reestruturação (*reassortment*) dos RVs (TANIGUCHI e URASAWA, 1995). A frequência de amostras não tipadas nos estudos que utilizaram somente EIE, variou de 8% a 46,2%. Esse fato pode ocorrer devido à existência de amostras mutantes que escapam ao reconhecimento pelos anticorpos monoclonais utilizados, ou devido à presença de sorotipos não usuais (ex: G5, G6, G8, G10 ou G12), anteriormente não detectados (SANTOS & HOSHINO, 2005). A metodologia RT-PCR para genotipagem de RV-A tem reduzido a frequência das amostras não tipadas, porém mutações no sítio de ligação do iniciador (*primer*) podem dificultar a caracterização dos RVs. Diversos estudos realizados demonstram frequência de 16% a 65% de amostras não tipadas por RT-PCR (SANTOS e HOSHINO, 2005). Com o objetivo de diminuir a frequência das amostras não tipadas Honma et al. (2007) e Santos et al. (2008) recentemente desenvolveram duas metodologias, RT-PCR ELISA e *Microarray* hibridização, com o objetivo de diminuir a frequência de amostras de RVs não tipadas por EIE ou RT-PCR.

Ambas as técnicas desenvolvidas empregam diversas sondas específicas para os tipos G (VP7) e P (VP4) demonstrando ser altamente sensíveis e específicas

5.4.3 Associação P(VP4) e G (VP7)

Estudos sobre a distribuição dos genótipos P e G de RV-A em humanos têm demonstrado o predomínio na frequência de algumas associações. Inicialmente, quatro associações foram comumente identificadas em crianças com diarreia em todo o mundo: P[8]G1; P[4]G2; P[8]G3 e P[8]G4, e atualmente P[8]G9 considerado o quinto de maior importância epidemiológica (HOSHINO e KAPIKIAN, 2000).

No presente trabalho as associações de RVs detectadas, P[8]G1, P[8]G9, P[4]G2, P[8]G4 e P[8]G3 foram as mais frequentes (92,1%). Foram observadas 17 outras associações consideradas não usuais, incluindo as infecções mistas, porém com menor frequência (7,9%).

A diversidade de associação P e G de amostras de RVs é frequentemente encontrada em países, onde se detecta alta percentagem de genótipos diferentes. As associações não usuais também podem emergir como resultado de infecções mistas de RVs, e estas são descritas em todo o mundo. As cepas de RVs não usuais têm sido mais elevadas nos países da África (27%), Ásia (14%) e América do Sul (11%) quando comparadas com os da América do Norte, Europa e Austrália, com percentagens de 5,0%; 1,4% e 0,1%, respectivamente (SANTOS e HOSHINO, 2005).

Em uma revisão de estudos realizados em diversos estados do Brasil, no período de 1982 a 2005, as infecções mistas de RVs representaram 189 (7,6%) de todas as amostras de RVs analisadas (n=2.492) e as associações não usuais representaram 172 (7,0%) (LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES, 2008). Entre as associações não

usuais relatadas pelos autores na revisão, merecem atenção as associações P[4]G8 e P[9]G10 detectados no Rio de Janeiro e Nordeste; P[9]G12 no estado do Paraná; P[4]G3 como causa de surto ocorrido em Minas Gerais e G6 no Estado de São Paulo.

5.4.4 Surtos

A notificação de surtos de diarreia aguda é imprescindível para desencadear uma investigação detalhada quanto a sua origem, se em comunidades fechadas, hospitais, ou devido a problemas ambientais, para se conhecer as possíveis causas de transmissão para que medidas eficazes de controle possam ser adotadas o mais precocemente possível (INSTITUTO ADOLFO LUTZ E CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA “PROFESSOR ALEXANDRE VRANJAC”, 2004).

Desde 2000, a vigilância do rotavírus no Estado de São Paulo vem sendo feita predominantemente, a partir da notificação de casos suspeitos envolvidos em surtos. São dois os sistemas de rotina que registram casos de gastroenterite: o programa de MDDA (vigilância sindrômica da diarreia aguda), implantado em unidades sentinelas, que permite o acompanhamento semanal da tendência da diarreia com o objetivo de identificar possíveis surtos, e o sistema de vigilância de surtos (doenças transmitidas por alimentos e SINAN) que congrega os dados de surtos causados por água ou alimentos, notificados e investigados. Os casos envolvidos em surtos de diarreia têm amostras coletadas para a análise laboratorial, a qual, em geral, é feita pelo IAL Central.

Foi considerado surto ou surto epidêmico de diarreia por rotavírus, a ocorrência em espaço delimitado de dois ou mais casos devido a um mesmo agente etiológico, isto é, com confirmação laboratorial, e apresentaram um elo epidemiológico/fonte comum entre eles identificado por investigação epidemiológica.

Entre as amostras de RVs que tiveram associação P e G caracterizadas foi possível observar ao longo do estudo, 08 surtos de diarreia ocorridos em diferentes municípios do estado de São Paulo, entre 2004 e 2006. Um surto foi caracterizado como P[6]G9 no município de Brodósqui, 3 surtos por P[8]G9 em Cerquilha, Sete Barras (Aldeia Indígena Pagua Ty) (COSTA et al., 2009) e Fernandópolis, 1 surto por P[8]G1 em Urânia, 1 surto P[8]G1+G9 em Martinópolis e 2 surtos por P[4]G2 nas cidades de Pitangueiras e Salto. Alguns destes acometeram tanto crianças como adultos, e de forma grave levando a hospitalização, demonstrando a virulência desses genótipos.

Merece atenção o surto ocorrido na Aldeia Indígena Pagua Ty, Município de Sete Barras (Região de Registro), onde 31 casos foram notificados à Vigilância Epidemiológica, Centro de Registro de Pólos-Base - Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). As três amostras encaminhadas para análise laboratorial e posteriormente positivas para rotavírus foram genotipadas como P[8]G9. Na literatura, há poucos estudos relatando a participação dos genótipos de rotavírus em populações indígenas. Em um estudo conduzido por Moulton et al. (1998) com crianças nativas americanas, durante 1992-1994, foram identificados os genótipos G1, G2, G3. No Brasil, Linhares et al. (1981), utilizando a técnica de imunofluorescência à base de neutralização, detectaram RV sorotipo G1 associados a um surto de diarreia aguda que ocorreu entre os índios Tiriyó, no norte do Estado do Pará em 1977.

Recentemente, Snelling et al. (2009) relataram a ocorrência de surto de

diarréia aguda em crianças indígenas na Austrália Central. O genótipo RVs G9 foi responsável pelo surto, vários meses após a introdução da vacina monovalente contra rotavírus RIX4414 vaccine.

A ocorrência de surtos por rotavírus é mais comum em instituições fechadas como creches, orfanatos, hospitais e entre os familiares comunicantes, onde o contato próximo pessoa-a-pessoa facilita a disseminação do vírus.

No nosso meio, atualmente poucos estudos têm descrito a caracterização dos genótipos de RVs responsáveis por surtos de diarréia aguda. Provavelmente, isto ocorra devido à dificuldade da investigação epidemiológica para estabelecer elo epidemiológico com a confirmação laboratorial.

Castro et al. (1994) identificaram o sorotipo G1 como causa de um surto diarréico ocorrido em uma creche no Rio de Janeiro e puderam verificar que no período de 1989 a 1991, antes da ocorrência do surto, somente o sorotipo G2 havia sido identificado nessa mesma creche.

No Estado de São Paulo, Timenetsky et al. (1996) descreveram um surto de gastroenterite grave por P[4]G2 ocorrido no Interior do Estado de São Paulo afetando adultos e crianças. O rotavírus foi detectado em 44% das amostras analisadas.

Rosa e Silva et al. (2002) descreveram um surto de diarréia, em Juiz de Fora, Minas Gerais, entre Maio e Agosto de 1998, ocasionado pelo genótipo P[4]G3, considerado uma cepa não usual.

Martini et al. (2008) relataram a ocorrência de dois surtos de grande proporção por rotavírus na cidade de Campinas, São Paulo, durante os anos de 2003 e 2004. Os genótipos G1 e G3 foram os responsáveis pelos surtos de diarréia, no período de 2003.

Já no ano de 2004, os autores descrevem que mais de 10 genótipos de RVs estiveram envolvidos nos surtos de diarreia, sendo os tipos P[8]G3 e P[8]G9 os mais prevalentes.

Na Irlanda, Feeney et al. (2006) também descreveram surtos de diarreia por RVs genótipos P[8]G1 e P[8]G9 acometendo idosos e de forma grave.

Nos Estados Unidos, Griffin et al. (2002) analisaram amostras provenientes de 263 surtos de diarreia aguda, entre Novembro de 1998 e Dezembro de 2000. Os autores identificaram 3 surtos associados ao RVs genótipo P[4]G2 entre adultos.

Mikami et al. (2004) descreveram um surto de diarreia grave envolvendo 45 crianças em idade escolar (entre 11 e 12 anos de idade), que participavam de uma excursão escolar, no Japão, em 2001. Investigações epidemiológicas e virológicas concluíram que o surto foi ocasionado pelo RV genótipo G2, e a sua transmissão foi de pessoa a pessoa. Este estudo enfatiza a importância dos RVs como causa de surtos de diarreia mesmo em crianças mais velhas e entre adultos.

Recentemente, Kirkwood et al. (2009) durante o Programa de Vigilância dos Rotavírus na Austrália associaram a predominância do genótipo P[4]G2 com um grande surto de diarreia grave, ocorrido em Alice Springs, no início de 2009.

Embora as infecções por RVs em adultos e em crianças mais velhas sejam relativamente raras, pois a imunidade geral confere proteção contra a doença por outros tipos de RVs, a predominância do RV G2 em surtos sugere que a imunidade natural para os genótipos mais comuns nem sempre oferece imunidade heterotípica aos RVs tipo G2 (GRIFFIN et al., 2002).

5.4.5 Análise Filogenética

A variação antigênica dentro de um sorotipo/genótipo é um mecanismo pelo qual

emergem variantes de RVs para escapar da imunidade do hospedeiro (TRINH et al., 2007).

Durante os últimos 35 anos, o RV G1 humano tem sido o genótipo predominante universalmente. Até o momento, quatro linhagens filogenéticas da proteína VP7 G1 têm sido relatadas (G1-I, G1-II, G1-III e G1-IV) (JIN et al., 1996). As linhagens da proteína VP7 G1 das vacinas contra rotavírus, monovalente (Rotarix®) e polivalente (Rotateq®), pertencem à linhagem G1-II e G1-III, respectivamente.

A fim de estabelecer se houve alguma alteração na antigenicidade das amostras de rotavírus G1, ao longo do presente estudo, enfocamos a análise da sequência da proteína VP7, por ser a principal proteína imunogênica do RV (ESTES, 2001).

No período analisado, 38 amostras de RVs VP7 G1 foram classificadas em duas linhagens distintas, a linhagem I (G1-I), com 44,7% (17/38) e a linhagem II (G1-II), com 55,3% (21 / 38). As linhagens G1-I foram detectadas em 1996-1997, 2001-2002 e 2004-006, enquanto que as linhagens G1-II foram identificadas em 1998-2001 e 2003-2005. Constata-se que as linhagens G1-II não foram detectadas no Estado de São Paulo após a introdução vacina Rotarix® (G1-II) no Brasil em 2006. Houve co-circulação das duas linhagens nos anos de 2001, 2004 e 2005. Cabe ressaltar que este é o primeiro relato de classificação dos RVs G1 em linhagens no Estado de São Paulo.

As 38 amostras de RVs G1 selecionadas demonstraram perfil longo com diferentes perfis eletroforéticos. Estudos realizados demonstram que a mudança de um nucleotídeo é capaz de alterar a migração do segmento genômico (DUNN et al., 1993; NAKAGOMI et al., 1988). Isto poderia explicar a diversidade eletroforética dos rotavírus isolados em relação à progressão temporal.

No Brasil estudos desenvolvidos por Araujo et al. (2007) demonstram a presença

do G1-I em 7 amostras de RVs, em 1986 e 2002 a 2004 na cidade do Rio de Janeiro. Os autores também descrevem a presença de 1 amostra G1-III. Em Belém do Pará, 5 amostras RVs G1 sequenciadas foram classificadas em G1-III (JIN et al., 1996).

Parra et al. (2005) demonstraram entre as amostras de RVs analisadas no Paraguai, a circulação do genótipo G1-I no ano de 1998, no ano seguinte circulou o genótipo G1-II. E no ano de 2000 houve a co-circulação das linhagens G1- I e G1-II do RV G1. Este fato provavelmente permitiria que as amostras de RVs G1 escapassem da imunidade natural adquirida.

Ensaio clínico realizado com uso das vacinas monovalentes e tetravalentes contra RVs demonstraram a ocorrência isolada de casos de diarreia pelo genótipo G1 (RUIZ-PALACIOS et al. 2006; VESIKARI et al., 2006) Isso pode ocorrer devido a diferentes linhagens encontradas entre os genótipos ou falha na vacina, porém estas hipóteses precisam ser avaliadas.

Uma nova nomenclatura para RVs G1 tem sido proposta para classificá-los em linhagens e sublinhagens. Até o momento, 11 linhagens e 17 sublinhagens foram descritas por Phan et al. (2007).

Na comparação de aminoácidos entre as amostras de RVs-G1, as sequências de aa TV-S nas posições 65, 66 e 68 têm sido propostas para diagnóstico de VP7 G1 linhagem I, e as sequências TA-A como linhagem II (PHAN et al., 2007)

No nosso estudo, ampla maioria das amostras RVs G1-I continha a sequência de aa TV-S, porém apenas uma amostra observou-se a sequência TV-F (IALR1204). Para linhagem II, todas as amostras continham a sequência de aa TA-A; com exceção em uma amostra, a IALR215, que apresentou a sequência TT-A, até então, nunca descrita para sequências de proteínas de amostras VP7 G1.

As amostras G1 do presente trabalho foram distintas da amostra de referência padrão Wa utilizada, tanto no nível de nucleotídeos quanto de aminoácidos. Principalmente nas regiões antigênicas A, B, C e F, onde se encontram os epítomos de neutralização envolvidos na determinação de sorotipos e na proteção. Foram observadas entre as amostra de rotavírus G1, 28 mudanças de aminoácidos quando comparadas com amostra de referencia padrão Wa, e 17 mudanças se comparadas com a amostra mais antiga do presente estudo (IALR113/96).

Alta variabilidade nas sequencias G1 também foi relatada por Arista et al. (2006). Os autores observaram pelo menos 23 substituições de aminoácidos, entre as amostras analisadas na Itália, entre 1986 e 2004.

No presente estudo, mudanças pontuais observadas nas regiões antigênicas não estiveram associadas com ocorrência das diferentes linhagens de rotavírus detectadas nos diferentes períodos do ano, e não foi detectada nenhuma evidência de mudanças cumulativas. Entretanto, alguns estudos demonstram a correlação entre as mudanças observadas nas regiões antigênicas com a detecção de distintas linhagens bem como sua predominância ao longo dos anos analisados (MAUNULA e VON BONSDORFF, 1998).

Análise da sequência da proteína VP7 de rotavírus demonstra existência de regiões altamente variáveis (VR1 a VR9) entre os diferentes sorotipos de rotavírus, e quatro regiões são consideradas como principais sítios antigênicos, ou seja, a região A (aa 87-101), B (aa 143-152), C (aa 208-224) e, F (aa235-242) (TRINH et al., 2007).

Nenhuma acumulação de mudanças de aminoácidos foi observada dentro de regiões antigênicas, porém em outras regiões do gene, em particular as regiões variáveis VR3 e VR4, as substituições foram detectadas como também observadas

anteriormente por Phan et al. (2007).

Outras mudanças foram observadas nas regiões antigênicas A, B e C, como T87I, E88D, N94S, D97E, D100N (região A), S147N (região B), e D213N, M217T, I218V (região C). Foi possível verificar que: (i) mudanças de aa na posição T87I é comumente observado em sequências de rotavírus VP7 G2, (ii) alterações D100N e D213N poderiam afetar o reconhecimento antigênico devido a uma mudança química na carga de aminoácidos. Estudos cristalográficos demonstraram que as regiões antigênicas A e C apresentam estreita proximidade (AOKI et al. 2009).

Mudança na região antigênica A (N94S) também foi observada por Arista et al. (2006) em amostras G1 analisadas na Itália, entre 1986 a 2004 e por Parra et al. (2005) em amostras analisadas do Paraguai, período de 1998 a 2000. No Brasil, Araujo et al. (2007) observaram a mudança nesta posição em amostras coletadas no período de 2001 a 2004, no Rio de Janeiro. O resíduo 94 tem sido considerado essencial para discriminação dos monotipos G1 e para distinção entre as linhagens de RVs (COULSON e KIRKWOOD, 1991).

As mudanças nas posições D97E (região A) e S147N (região B) são consideradas críticas para conservação dos epítomos neutralizantes (DYALL-SMITH et al., 1986; COULSON e KIRKWOOD, 1991). No presente estudo estas posições estiveram altamente conservadas entre as amostras de RVs G1- I e II. Mudanças similares também foram observadas em amostras brasileiras por Araujo et al. (2007).

A distribuição da diversidade de linhagens G1 no mundo demonstra que as diferentes linhagens filogenéticas podem ser dominantes em lugares e épocas distintos (TRINH et al., 2007; JIN et al., 1996; MAUNULLA e VON BONSDORFF et al., 1998; CASTELLO et al., 2006; PHAN et al., 2007; PARRA et al., 2007).

As consequências epidemiológicas desta distribuição heterogênea nos programas de vacinação contra o rotavírus necessitam de contínua avaliação. Neste estudo, análises preliminares mostraram que a vacina Rotarix® demonstrou ser eficiente contra ambos os RVs linhagens G1-I e G1-II. No geral, estes resultados sugerem que as linhagens G1-I e -G1-II são possíveis de ser diferenciadas e poderia representar populações distintas evolutivas, que está de acordo com trabalhos anteriores descritos (COULSON e KIRKWOOD, 1991; MAUNULLA e VON BONSDORFF et al., 1998). O significado destes achados para a eficácia da vacinação não é possível determinar no momento.

Nossos dados demonstram que há desafios para a confecção da vacina contra rotavírus para população brasileira, devendo ser formulada de acordo com a localização geográfica e a distribuição dos genótipos/sorotipos mais frequentes. Entre a população brasileira, deve ser considerada a introdução do sorotipo G9, devido sua relevância demonstrada no presente estudo, além dos tipos G1, G2, G3 e G4, considerados de importância epidemiológica mundialmente. Do mesmo modo, o estudo enfatizou a importância do monitoramento contínuo dos RVs-A circulantes de maneira a permitir identificar emergência e/ou re-emergência de genótipos, novas variantes genéticas, possíveis mudanças antigênicas que possam ter algum efeito na efetividade da vacinação contra RV-A utilizada atualmente (KAPIKIAN e HOSHINO, 2007).

Com a implantação de uma nova vacina é necessário aprimoramento da vigilância epidemiológica como forma de monitorar sua efetividade e real impacto na morbidade da doença nos grupos alvos. Após quatro anos de introdução da vacinação, a vigilância do rotavírus no Estado de São Paulo deve incorporar algumas estratégias que possibilitem identificar com maior precisão o perfil epidemiológico pós-vacinação e

as possíveis mudanças na incidência da doença no grupo populacional alvo e, conseqüentemente, a efetividade do programa de imunização.

6 CONCLUSÕES

- a) A presença de rotavírus foi observada em 20% (n=1.784) das 8.961 amostras de fezes analisadas de pacientes com diarreia aguda, provenientes de diversos municípios do Estado de São Paulo, entre 1996 e 2006.
- b) Neste estudo foi possível observar a ampla diversidade de RVs no nosso meio. Entre as 1.300 amostras de RVs selecionadas para caracterização em genótipos G (VP7) e (VP4), o tipo G1 foi o mais frequente, seguido dos tipos G9, G2, G3, G4 e G12. Verificou-se 1,8% de mistura de genótipos G entre as amostras analisadas, com diferentes combinações. Em relação ao genótipo P, o tipo P[8] foi o mais predominante, seguido dos tipos P[4], P[6], P[9], P[10], e P[3]. Verificou-se 1,0% de mistura de genótipos P. As associações P(VP4) e G(VP7) dos rotavírus foram determinadas em 51,5% das amostras analisadas. A associação P e G mais predominante entre as amostras de rotavírus foi P[8]G1, seguidos P[8]G9, P[4]G2, P[8]G4 e P[8]G3. Infecções mistas e associações consideradas não usuais também foram observadas em 7,9% das amostras.
- c) O genótipo G1 foi o mais frequente durante 7 anos, ou seja, entre 1996 e 2001 e 2003. A emergência do genótipo G9 pôde ser verificada a partir do ano 2000, sendo o tipo mais predominante nos anos 2002, 2004 e 2005. No ano de 2006, o tipo G2 foi o mais frequente entre os tipos G de rotavírus, representando 28,9% das infecções, seguidos dos tipos G9, G1 e G3. O genótipo G12 foi detectado apenas no ano de 2004 em pacientes provenientes do município de Guarulhos,

com características sócio-econômicas menos favorecidas. Em relação ao genótipo P, o tipo P[8] foi o mais predominante em todos os anos, seguidos dos tipos P[4], P[6], P[9], P[10] e P[3]. Entretanto, nota-se a exceção em 2006, onde genótipo P[4] foi o mais frequente entre os tipos de rotavírus.

- d) Foi possível identificar 8 surtos de diarreia agudas por RVs comparando-se os dados laboratoriais com os dados epidemiológicos do CVE/SP, em diversos municípios do Estado de São Paulo, nos anos de 2004 a 2006. O genótipo P[6]G9 foi responsável pelo surto no município de Brodósqui, P[8]G9 responsável por surtos ocorridos nos municípios de Cerquilha, Sete Barras e Fernandópolis, P[8]G1 responsável pelo surto no município de Urânia, P[8]G1+G9 pelo surto no município de Martinópolis e P[4]G2 pelo surto nos municípios de Pitangueiras e Salto. Alguns destes acometeram tanto crianças como adultos, e de forma grave levando a hospitalização, demonstrando a virulência desses genótipos.
- e) As 38 amostras sequenciadas e analisadas quanto à filogenia do gene 9 VP7 G1 foram agrupadas em duas linhagens distintas: G1-I (44,7%) e G1-II (55,3%), quando comparadas com as cepas padrões humanas. Este é o primeiro relato de classificação da VP7 G1 em linhagens no Estado de São Paulo.
- f) Foram detectadas mudanças de aminoácidos entre as amostras de RVs G1 de mesma linhagem, indicando a presença de polimorfismo ou subtipos. Entretanto, nenhum acúmulo de mutações de aminoácidos foi observado dentro das regiões

antigênicas.

- g) Análises preliminares sugerem que a vacina anti-RV-A disponível no calendário infantil brasileiro, Rotarix[®] G1 linhagem II demonstrou ser eficiente contra ambas as linhagens dos vírus G1-I e G1-II detectadas neste estudo, porém análises adicionais serão necessárias para confirmar os achados.

REFERÊNCIAS*

ABE, M.; ITO, N.; MORIKAWA, S.; TAKASU, M.; MURASE, T.; KAWASHIMA, T.; KAWAI, Y.; KOHARA, J.; SUGIYAMA, M. Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. **Virus Res.**, v. 144, p. 250-7, 2009.

AHMED, K.; ANH, D.D.; NAKAGOMI, O. Rotavirus G5P[6] in child with diarrhea, Vietnam. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 13, n.8, p. 1232-5, 2007.

AHMED, M. U.; KOBAYASHI, N.; WAKUDA, M.; SANEKATA, T.; TANIGUCHI, K.; KADER, A.; NAIK, T.N.; ISHINO, M.; ALAM, M. M.; KOJIMA, K.; MISE, K.; SUMI, A. Genetic analysis of group B human rotaviruses detected in Bangladesh in 2000 and 2001. **J. Med. Virol.**, v 72, p. 149-55, 2004.

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Trans. Autom. Contr.**, v. 19, p. 716-23, 1974.

ANDERSON, E. J.; WEBER, S. G. Rotavirus infection in adults. **Lancet Infect. Dis.**, v. 4, p. 91-9, 2004.

ANDREASI, M. S.; BATISTA, S. M.; TOZETTI, I. A.; OZAKI, C. O.; NOGUEIRA, M. M.; FIACCADORI, F. S.; BORGES, A. M.; SANTOS, R. A.; CARDOSO, D. D. Rotavirus A among hospitalized infants, up to three years of age, with acute gastroenteritis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, p. 411-4, 2007.

AOKI, S. T.; SETTEMBRE, E. C.; TRASK, S. D.; GREENBERG, R. B.; HARRISON, S. C.; DORMITZER, P. R. Structure of Rotavirus Outer-Layer Protein VP7 Bound with a Neutralizing Fab. **Science**, v. 324, p. 1444-7, 2009.

ARAÚJO, I. T.; ASSIS, R. M.; FIALHO, A. M.; MASCARENHAS, J. D.; HEINEMANN, M. B.; LEITE, J. P. Brazilian P[8], G1, P[8], G5, P[8], G9 and P[4], G2 rotavirus strains: nucleotide sequence and phylogenetic analysis. **J. Med. Virol.**, v. 79, p. 995-1001, 2007.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ARAÚJO, I. T.; FERREIRA, M. S.; FIALHO, A. M.; ASSIS, R. M.; CRUZ, C. M.; ROCHA,

M.; LEITE, J. P. Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9 and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 5, p. 1999-2001, 2001.

ARISTA, S.L.; GIAMMANCO, G. M.; DE GRAZIA, S.; RAMIREZ, S.; LO BIUNDO, C.; COLOMBA, C.; CASCIO, A.; MARTELLA, V. Heterogeneity and temporal dynamics of evolution of G1 human rotaviruses in a settled population. **J. Virol.**, v. 80, n. 21, p. 10724-33, 2006.

ARISTA, S. L.; GIOVANNELLI, L.; TITONE, L. Detection of antigenically distinct human rotavirus in Palermo. **Ann. Inst. Pasteur Virol.**, v. 136, p. 229-35, 1985.

AUNG, T. S.; KOBAYASHI, N.; NAGASHIMA, S.; GHOSH, S.; AUNG, M. S.; OO., K.Y.; WIN, N. Detection of group B rotavirus in an adult with acute gastroenteritis in Yangon, Myanmar. **J. Med. Virol.**, v. 81, n. 11, p. 1968-74, 2009.

BALL, M. J.; TIAN, P.; ZENG, C. Q.-Y.; MORRIS, A. P. ESTES, M. K. - Age-Dependent Diarrhea Induced by a Rotaviral Nonstructural Glycoprotein. **Science**, v. 272, p. 101-04, 1996.

BÁNYAI, K.; ESONA, M. D.; MIJATOVIC, S.; KERIN, T. K.; PEDREIRA, C.; MERCADO, J.; BALMASEDA, A.; PEREZ, M. C.; PATEL, M. M.; GENTSCH, J. R. Zoonotic bovine rotavirus strain in a diarrheic child, Nicaragua. **J. Clin. Virol.**, v. 46, p. 391-3, 2009.

BÁNYAI, K.; JIANG, B.; BOGDÁN, A.; HORVÁTH, B.; JAKAB, F.; MELEG, E.; MARTELLA, V.; MAGYARI, L.; MELEGH, B.; SZUCS, G. Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. **J. Clin. Virol.**, v. 37, p. 317-22, 2006.

BARMAN, P.; GHOSH, S.; SAMAJDAR, S.; MITRA, U.; DUTTA, P.; BHATTACHARYA, S. K.; KRISHNAN, T.; KOBAYASHI, N.; NAIK, T.N. RT-PCR based diagnosis revealed importance of human group B rotavirus infection in childhood diarrhoea. **J. Clin. Virol.**, v. 36, p. 222-7, 2006.

BARNES, G. L.; BISHOP, R.F. Rotavirus infection and prevention. **Curr. Opin. Pediatr.**, v. 9, n. 1, p. 19-23, 1997.

BARNES, G. L.; LUND, J. S.; MITCHELL, S. V.; DE BRUYN, L.; PIGGFORD, L.;

SMITH, A. L.; FURMEDGE, J.; MASENDYCZ, P. J.; BUGG, H. C.; BOGDANOVIC-SAKRAN, N.; CARLIN, J. B.; BISHOP, R. F. Early phase II trial of human rotavirus vaccine candidate RV3. **Vaccine**, v. 26, n. 20, p. 2950-6, 2002.

BERN, C.; UNICOMB, L.; GENTSCH, J. R.; BANUL, N.; YUNUS, M.; SACK, R. B.; GLASS, R. I. Rotavirus diarrhea in Bangladesh children: correlation of disease severity with serotypes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 323-38, 1992.

BERNSTEIN, D. I.; SACK, D. A.; REISINGER, K.; ROTHSTEIN, E.; WARD, R. L. Second-year follow-up evaluation of live, attenuated human rotavirus vaccine 89-12 in healthy infants. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 1487-9, 2002.

BHAN, M. K.; LEW, J. F.; SAZAWAL, S.; DAS, B. K.; GENTSCH, J. R.; GLASS, R. I. Protection conferred by neonatal rotavirus infection against subsequent rotavirus diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v. 168, p. 282-7, 1993.

BHANDARI, N.; SHARMA, P.; GLASS, R. I.; RAY, P.; GREENBERG, H.; TANEJA, S.; SAKSENA, M.; RAO, C. D.; GENTSCH, J. R.; PARASHAR, U.; MALDONADO, Y.; WARD, R. L.; BHAN, M. K. Safety and immunogenicity of two live attenuated human rotavirus vaccine candidates, 116E and I321, in infants: Results of a randomised controlled trial. **Vaccine**, v. 24, p. 5817-23, 2006.

BISHOP, R. F.; BARNES, G. L.; CIPRIANI, E.; LUND, J.S. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection: a prospective, longitudinal study in young children. **The New Engl. Med.**, v. 309, p. 72-6, 1983.

BISHOP, R. F.; BUGG, H. C.; MASENDYCZ, P. J.; LUND, J. S.; GORRELL, R. J.; BARNES, G. L. Serum, fecal & breast milk rotavirus antibodies as indices in other infant pairs. **The J. Infect. Dis.**, v. 174, p. 22-9, 1996.

BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, I. H.; RUCK, B.J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenterites. **Lancet**, v. 2, p. 1281-3, 1973.

BLACK, R. E.; MORRIS, S. S.; BRYCE, J. Where and why are 10 million children dying every year? **Lancet**, v. 361, p. 2226-34, 2003.

BOK, K.; CASTAGNARO, N.; BORSA, A.; NATES, S.; ESPUL, C.; FAY, O.; FABRI, A,

GRINSTEIN, S.; MICELI, I.; MATSON, D. O.; GÓMEZ, J. A. Surveillance for rotavirus in Argentina. **J. Med. Virol.**, v. 65, n. 1, p. 190-8, 2001.

BRANDT, C. D.; KIM, H. W.; RODRIGUEZ, W.J.; THOMAS, L.; YOLKEN, R.H.; ARROBIO, J.O.; KAPIKIAN, A.Z.; PARROTT, R.H.; CHANOCK, R.M. Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy, and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. **J. Clin. Microbiol.**, v.13, n. 5, p. 976-81, 1981.

BRANDT, C. D.; ARNDT, C. W.; EVANS, G. L.; KIM, H. W.; STALLINGS, E. P.; RODRIGUEZ, W. J.; PARROTT, R. H. Evaluation of a latex test for rotavirus detection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, n. 9, p. 1800-2, 1987.

BRESEE, J. S.; PARASHAR, U. D.; WIDDOWSON, M. A.; GENTSCH, J. R.; STEELE, A. D.; GLASS, R. I. Update on rotavirus vaccines. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 24, n. 11, p. 947-52, 2005.

BRESEE, J.; FANG, Z. Y.; WANG, B.; NELSON, E. A.; TAM, J.; SOENARTO, Y.; WILOPO, S. A.; KILGORE, P.; KIM, J. S.; KANG, J. O.; LAN, W. S.; GAIK, C. L.; MOE, K.; CHEN, K. T.; JIRAPHONGSA, C.; PONGUSWANNA, Y.; NGUYEN, V. M.; PHAN, V. T.; LE, T. L.; HUMMELMAN, E.; GENTSCH, J. R.; GLASS, R. First report from the Asian Rotavirus Surveillance Network. **Emerg. Infect. Dis.**; v. 10, p. 988-95, 2004.

BURNS, J. W.; SIADAT-PAJOUH, M.; KRISHNANEY, A. A.; GREENBERG, H. B. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies lack neutralizing activity. **Science**, v. 272, p. 104-7, 1996.

CANDEIAS, J. A. N.; BALDACCI, E. R.; BREVIGLIERI, J. C.; GRISI, S. J. E.; RÁCZ, M. L.; HARSI, C. M. Diagnostico de infeções por rotavirus através da reação de imunofluorescencia indireta. **Rev. Microbiol.**, v. 11, p. 76-8, 1980.

CANDEIAS, J. A. N.; ROSENBERG, C. P.; RÁCZ, M. L. Identificação por contraímunoelctroforese de rotavírus em casos de diarreia infantil. **Rev. Saude. Publ.**, v. 12, p. 99-103, 1978.

CARDOSO, D. D.; RÁCZ, M. L.; AZEVEDO, M. S.; MARTINS, R. M.; SOARES, C. M. Genotyping of group A rotavirus samples from Brazilian children by probe hybridization. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, n. 4, p. 471-3, 2001.

CARDOSO, D. D.; SOARES, C. M.; DIAS E SOUZA, M. B.; AZEVEDO, M.da S.; MARTINS, R. M.; QUEIRÓZ, D. A.; BRITO, W. M.; MUNFORD, V.; RÁCZ, M. L. Epidemiological features of rotavirus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 1, p. 25-9, 2003.

CARMONA, R. C.; TIMENETSKY, M do C.; SILVA, F. F.; GRANATO, C. F. Characterization of rotavirus strains from hospitalized and outpatient. **J. Med. Virol.**, v. 74, n. 1, p. 166-72, 2004.

CARMONA, R. C.; TIMENETSKY, M. do C.; MORILLO, S. G.; RICHTZENHAIN, L. J. Human rotavirus serotype G9, São Paulo, Brazil, 1996-2003. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, p. 963-8, 2006.

CARMONA, R. C. C.; MORILLO, S. G.; LUCHS, A.; RIBEIRO, C. D.; CALUX, S. J.; EDUARDO, M. B. P.; TIMENETSKY, M. C. S. T. Rotavirus detected among children with acute gastroenteritis after vaccine introduction in São Paulo, Brazil. **Vírus Rev. Res.**, v. 14, p. 190, 2009. Suplemento. Apresentado no XX National Meeting of Virology, 1., 2009, Brasília.

CARNEIRO, N.B.; DINIZ-SANTOS, D. R.; FAGUNDES, S. Q.; NEVES, L. L.; REGES, R. M.; LIMA, E. K.; QUADROS, V. H.; SOARES, L. E.; SILVA, F. S.; SCHNEITER, H. de G.; FIGUEIREDO, I.; SILVA, L. R. Clinical and epidemiological aspects of children hospitalized with severe rotavirus-associated gastroenteritis in Salvador, BA, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, p. 525-8, 2005.

CARRARO, E.; PEROSA, A. H.; SIQUEIRA, I.; PASTERNAK, J.; MARTINO, M. D. Rotavirus infection in children and adult patients attending in a tertiary Hospital of São Paulo, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 12, n. 1, p. 44-6, 2008.

CARVALHO-COSTA, F. A.; ASSIS, R. M.; FIALHO, A. M.; BÓIA, M. N.; ALVES, D. P.; MARTINS, C. M.; LEITE, J.P. Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 3, p. 291-4, 2006.

CARVALHO-COSTA, F. A.; ARAÚJO, I. T.; ASSIS, R. M. S.; FIALHO, A. M.; MARTINS, C.M. de A.; BÓIA, M. N.; LEITE, J.P. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 15, n. 1, p. 95-7, 2009.

CASTELLO, A. A.; ARGÜELLES, M. H.; VILLEGAS, G. A.; OLTHOFF, A.; GLIKMANN, G. Incidence and prevalence of human group C rotavirus infections in Argentina. **J. Med. Virol.**, v. 67, p. 106-12, 2002.

CASTELLO, A. A.; ARVAY, M. L.; GLASS, R. I., GENTSCH, J. Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 23, p. 168-72, 2004.

CASTELLO, A. A.; ARGÜELLES, M. H.; ROTA, R. P.; OLTHOFF, A.; JIANG, B.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J. R. ; GLIKMANN, G. Molecular epidemiology of group A rotavirus diarrhea among children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and emergence of the infrequent genotype G12. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 6, p. 2046-50, 2006.

CASTELLO, A. A.; NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O.; JIANG, B.; KANG, J. O.; GLASS, R. I.; GLIKMANN, G.; GENTSCH, J. R. Characterization of genotype P[9]G12 rotavirus strains from Argentina: high similarity with Japanese and Korean G12 strains. **J. Med. Virol.**; v. 81, p. 371-81, 2009.

CASTRO, L.; RODRIGUESP, D.; FLAUZINO, R.; MOURA, M.; LEITE, J. P. G. An outbreak of diarrhea associated with rotavirus serotype 1 in a day care nursery in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 5-9, 1994.

CAUL, E. O.; ASHLEY, C. R.; DARVILLE, J. M.; BRIDGER, J. C. Group C rotavirus associated with fatal enteritis in a family outbreak. **J. Med. Virol.**, v. 30, p. 201-5, 1990.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Withdrawal of rotavirus vaccine recommendation. **MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.**, v. 48, n. 43, p. 1007, 1999a.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine – United States, 1998-1999. **MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.**, v. 48, n. 27, p. 577-81, 1999b.

CHANDRAN, A.; HEINZEN, R. R.; SANTOSHAM, M.; SIBERRY, G. K. Nosocomial rotavirus infections: a systematic review. **J. Pediatr.**, v. 149, p. 441-7, 2006.

CHANG, H. G.; SMITH, P. F.; TSERENPUNTSAG, B.; MARKEY, K.; PARASHAR, U.; MORSE, D. L. Reduction in hospitalizations for diarrhea and rotavirus infections in New York state following introduction of rotavirus vaccine. **Vaccine**, v. 28, n.3, p. 754-8, 2010

CHEN, C. M.; HUNG, T.; BRIDGER, J. C.; MCCRAE, M. A. Chinese adult rotavirus is a group B rotavirus. **Lancet**, v. 2, p. 1123 - 4, 1985.

CHOMEZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v. 162, n. 1, p. 156-9, 1987.

CIARLET, M.; HIDALGO, M.; LIPRANDI, F. Cross-reactive, serotype- and monotype-specific neutralization epitopes on VP7 of serotype G3 and G5 porcine rotavirus strains. **Arch. Virol.**, v. 141, p. 601-14, 1996.

CICIRELLO, H. G.; GLASS, R. I. Current concepts of the epidemiology of diarrheal diseases. **Sem. Pediat. Inf. Dis.**, v. 5, p. 163-167, 1994.

CLARK, H. F.; HOSHINO, Y.; BELL, L. M.; GROFF, J.; HESS, G.; BACHMAN, P.; OFFIT, P. A. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, n. 9, p. 1757-62, 1987,

CLARK, F. H.; BORIAN, F. E.; BELL, L. M.; MODESTO, K.; GOUVEA, V.; PLOTKIN, S.A. Protective effect of WC3 vaccine against rotavirus diarrhea in infants during a predominantly serotype 1 rotavirus season. **J. Infect. Dis.**, v. 158, p. 570-87, 1988.

CLARK, H. F.; LAWLEY D. A.; SCHAFFER, A.; PATACSIL, J. M.; MARCELLO, A. E.; GLASS, R. I.; JAIN, V.; GENTSCH, J.R. Assessment of the epidemic potential of a new strain of rotavirus associated with the novel G9 serotype which caused an outbreak in the United States for the first time in the 1995–1996 season. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1434-8, 2004.

COLUCHI, N.; MUNFORD, V.; MANZUR, J.; VAZQUEZ, C.; ESCOBAR, M.; WEBER, E.; MÁRMOL, P.; RÁCZ, M. L. Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of rotavirus strains in children with acute diarrhea in Paraguay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 5, p. 1709-14, 2002.

COOK, N.; BRIDGER, J.; KENDALL, K.; GOMARA, M. I.; EL-ATTAR, L.; GRAY, J. The zoonotic potential of rotavirus. **J. Infect.**, v. 48, p. 289-302, 2004.

COOK, S. M.; GLASS, R. I.; LEBARON, C. W.; HO, M. S. Global seasonality of rotavirus infections. **Bull. W.H.O.**, v. 68, p. 171-7, 1990.

CORREIA, J. B.; PATEL, M. M.; NAKAGOMI, O.; MONTENEGRO, F. M.; GERMANO, E. M.; CORREIA, N. B.; CUEVAS, L. E.; PARASHAR, U. D.; CUNLIFFE, N. A.; NAKAGOMI, T. Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P[4] strains in Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 201, n. 3, p. 363-9, 2010.

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

COSTA, F. F.; LUCHS, A.; CILLI, A.; MORILLO, S. G.; CARMONA, R. de C.; TIMENETSKY, M. do C. Rotavirus genotype G9P[8] among Peguaó Ty Indian community in São Paulo, Brazil. **J. Clin. Virol.**, v. 46, n. 4, p. 387-8, 2009.

COULSON, B. S.; KIRKWOOD, C. Relation of VP7 amino acid sequence to monoclonal antibody neutralization of rotavirus and rotavirus monotype. **J. Virol.**, v. 65, n. 11, p. 5968-74, 1991.

CURNS, A. T.; STEINER, C. A.; BARRETT, M.; HUNTER, K.; WILSON, E.; PARASHAR, U. D. Reduction in acute gastroenteritis hospitalizations among US children after introduction of rotavirus vaccine: analysis of hospital discharge data from 18 US states.. **J. Infect. Dis.**, v. 201, n. 11, p. 1617-24, 2010.

COX, M. J.; AZEVEDO, R. S.; NOKES, D. J.; BEARDS, G. M.; MCCRAE, M. A.; MASSAD, E.; MEDLEY, G. F.; Seroepidemiology of group A rotavirus in suburban São Paulo, Brazil. **Epidemiol. Infect.**, v. 120, p. 327-3, 1998.

DAS, B. K.; GENTSCH, J. R.; CICIRELLO, H. G.; WOODS, P. A.; GUPTA, A.; RAMACHANDRAN, M.; KUMAR, R.; BHAN, M. K.; GLASS, R. I. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 7, p. 1820-2, 1994.

DEL REFUGIO GONZÁLEZ-LOSA, M.; POLANCO-MARÍN G. G.; MANZANO-CABRERA, L.; PUERTO-SOLÍS, M. Acute gastroenteritis associated with rotavirus in adults. **Arch. Med. Res.**, v. 32, p. 164-7, 2001.

DENNEHY, P. H.; GAUNTLETT, D. R.; TENDE, W. E. Comparison of nine commercial immunoassay for the detection of rotavirus in faecal samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, p. 1630-48, 1988.

DENNEHY, P. H.; BERTRAND, H. R.; SILAS, P. E.; DAMASO, S.; FRIEDLAND, L. R.; ABU-ELYAZEED, R. Coadministration of RIX4414 oral human rotavirus vaccine does not impact the immune response to antigens contained in routine infant vaccines in the United States. **Pediatrics**, v. 122, p. 1062-6, 2008.

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

DESSELBERGER, U.; MANKTELOW, E. ; LI, W.; CHEUNG, W; ITURRIZA-GÓMARA, M.; GRAY, J. Rotaviruses and rotavirus vaccines. **Br. Med. Bull.**, v. 90, p. 37-51, 2009.

DIMITROV, D. H.; ESTES, M. K.; RANGELOVA, S. M.; SHINDAROV, L. M.; MELNICK, J. L.; GRAHAM, D. Y. Detection of antigenically distinct rotaviruses from infants. **Infect. Immun.**, v. 41, p. 523-6, 1983.

DUAN, Z.; LI, D. D.; ZHANG, Q.; LIU, N.; HUANG, C. P.; JIANG, X.; JIANG, B.; GLASS, R.; STEELE, D.; TANG, J. Y.; WANG, Z. S.; FANG, Z. Y. J. Novel human rotavirus of genotype G5P[6] identified in a stool specimen from a Chinese girl with diarrhea. **Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 1614-7, 2007.

DUNN, S. J.; GREENBERG, H. B.; WARD, R. L.; NAKAGOMI, O.; BURNS, J. W.; VO, P. T.; PAX, K. A.; DAS, M.; GOWDA, K.; RAO, C. D. Serotypic and genotypic characterization of human serotype 10 rotavirus from asymptomatic neonates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 165 - 9, 1993.

DUNN, S. J.; WARD, R. L.; McNEAL, M. M.; CROSS, T. L.; GREENBERG, H. B. Identification of a new neutralization epitope on VP7 of human serotype 2 rotavirus and evidence for electrophoretic differences caused by single nucleotide substitutions. **Virology**, v. 197, p. 397-404, 1993.

DUNN, S. J.; FIORE, L.; WERNER, R. L.; CROSS, T. L.; BROOME, R. L.; RUGGERI, F. M.; GREENBERG, H. B. Immunogenicity, antigenicity and protection efficacy of baculovirus expressed VP4 trypsin cleavage products, VP5* and VP8* from rhesus rotavirus. **Arch. Virol.**, v. 140, p. 1969-78, 1995.

DURIGON, E. L.; CANDEIAS, J. A. N.; JEREZ, J. A.; BITTENCOURT, M. J.; ORTOLANI, E. L. Comparison of Staphylococcal co-agglutination with other assays for rapid diagnosis of rotavirus infection in humans, calves and piglets. **J. Virol. Methods**, v. 35, p. 73-9, 1991.

DYALL-SMITH, M. L.; LAZDINS, I.; TREGGAR, G. W.; HOLMES, I. H. Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 83, n. 10, p. 3465-8, 1986.

EDMONSON, L. M.; EBBERT, J. O.; EVANS, J. M. Report of a rotavirus outbreak in an adult nursing home population. **J. Am. Med. Dir. Assoc.**, v. 1, p. 175-9, 2000.

ESPARZA-AGUILAR, M.; BAUTISTA-MÁRQUEZ, A.; GONZÁLEZ-ANDRADE, M. C, RICHARDSON-LÓPEZ-COLLADA V. L. Analysis of the mortality due to diarrhea in younger children, before and after the introduction of rotavirus vaccine. **Salud Publica Mex.**, v. 51, n. 4, p. 285-90, 2009.

ESPEJO, R. T.; PUERTO, F.; SOLER, C.; GONZÁLES, N. Characterization of a human pararotavirus. **Infect. Immun.**, v. 44, p. 112-6, 1984.

ESPÍNOLA, E. E.; PARRA, G. I.; RUSSOMANDO, G.; ARBIZA, J. Genetic diversity of the VP4 and VP7 genes affects the genotyping of rotaviruses: analysis of Paraguayan strains. **Infect. Genet. Evol.**, v. 8, n. 1, p. 94-9, 2008.

ESTEBAN, L. E.; ROTA, R. P.; GENTSCH, J. R.; JIANG, B.; ESONA, M.; GLASS R. I.; GLIKMANN, G.; CASTELLO, A. A. Molecular epidemiology of group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina 2004-2007: reemergence of G2P[4] and emergence of G9P[8] strains. **J. Med. Virol.**, v. 82, n. 6, p. 1083-93, 2010.

ESTES, M. K. Advances in molecular biology: impact on rotavirus vaccine development. **J. Infect. Dis.**, v. 174, n. 1, p. S37-46. 1996.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E. **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1917-74.

ESTES, M. K.; COHEN, J. Rotaviruses Gene Structure and Function. **Microbiol. Rev.**,

v. 53, p. 410-49, 1989.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott & Wilkins, 2001. p 1426-54.

ESTES, M. K., GRAHAM, D. Y.; DIMITROV, D. H. The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. **Prog. Med. Virol.**, v. 29, p. 1-22, 1984.

FANG, Z.; YE, Q.; HO, M.; DONG, H.; QING, S.; PEÑARANDA, M.E.; HUNG, T.; WEN, L.; GLASS, R.I. Investigation of an outbreak of adult diarrhea rotavirus in China. **J. Infect. Dis.**, v. 160, p. 948-53, 1989.

FEENEY, S. A.; MITCHELL, S. J.; MITCHELL, F.; WYATT, D. E.; FAIRLEY, D.; MCCAUGHEY, C.; COYLE, P. V.; O'NEILL, H. J. Association of the G4 rotavirus genotype with gastroenteritis in adults. **J. Med. Virol.**, v. 78, n. 8, p. 1119-23, 2006.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **J. Mol. Evol.**, v.17, n.6, p.368-76,1981.

FISCHER, T. K.; BRESEE, J.cS.; GLASS, R.cl. Rotavirus vaccines and the prevention of hospital-acquired diarrhea in children. **Vaccine**, v. 22, p. S49-54, 2004.

FISCHER, T. K.; EUGEN-OSLEN, J.; PEDERSEN, A. G.; MOLBAK, K.; BOTTIGER, B.; ROSTGAARD, K.; NIELSEN, N. M. Characterization of rotavirus strains in a Danish population: high frequency of mixed infection and diversity within the VP4 gene of P[8] strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 1099–104, 2005.

FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A.S.; DAVIS, H. Virus particles in gastroenteritis. **Lancet**, v. 2, p. 1497, 1973.

FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, H. Diagnostic electron microscopy of faeces. I - The viral flora of the faeces as seen by electron microscopy. **J. Clin. Pathol.**, v. 27, p. 603-8, 1974.

FUJII, R.; HAMANO, M.; YAMADA, M.; YAMASAKI, S. Detection of human group C rotaviruses by enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 1307-11, 1992.

GABBAY, Y. B.; BORGES, A. A.; OLIVEIRA, D. S.; LINHARES, A. C.; MASCARENHAS, J. D.; BARARDI, C. R.; SIMÕES, C. M.; WANG, Y.; GLASS R. I.; JIANG, B. Evidence for zoonotic transmission of group C rotavirus among children in Belem. **Braz. J. Med. Virol.**, v. 80, p. 1666–74, 2008.

GABBAY, Y. B.; JIANG, B.; OLIVEIRA, C. S.; MASCARENHAS, J. D.; LEITE, J. P.; GLASS, R. I.; LINHARES, A. C. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among children attending a day-care centre in Belem, Brazil. **J. Diarrhoeal. Dis. Res.**, v. 17, p. 69-74, 1999.

GAGGERO, A., AVENDANO, L., FERNANDEZ, J., SPENCER, E. Nosocomial transmission of rotavirus from patients admitted with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 3294-7, 1992.

GENTSCH, J. R.; GLASS, R. I.; WOODS, P.; GOUVEA, V.; GORZIGLIA, M.; FLORES, J.; DAS, B. K.; R. M. K. Identification of group A rotavirus gene 4 types by Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 1365 - 73, 1992.

GENTSCH, J. R.; LAIRD, A. R.; BIELFELT, B.; GRIFFIN, D. D.; BANYAI, K.; RAMACHANDRAN, M.; JAIN, V.; CUNLIFFE, N. A.; NAKAGOMI, O.; KIRKWOOD, C. D.; FISCHER, T. K.; PARASHAR, U. D.; BRESEE, J. S.; JIANG, B.; GLASS, R. I. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. **J. Infect. Dis.**, v. 192, n. 1, p. S146-59, 2005.

GERNA, G.; SARASINI, A.; TORSELINI, N.; TORRE, D.; PAREA, M.; BATTAGLIA, M. Group - and - type specific serologic response in infants and children with primary rotavirus infections and gastroenteritis caused by a strain of know serotype. **J. Infect. Dis.**, v. 161, p. 1105-11, 1990.

GLASS, R. I.; BRESEE, J. S.; PARASHAR, U.; TURCIOS, R.; FISCHER, T.; JIANG, B.; WIDDOWSON, M. A.; GENTSCH, J.R. Rotavirus vaccines: past, present, and future. **Arch. Pediatr.**, v. 12, p. 844-7, 2005.

GLASS, R. I.; PARASHAR, U. D.; BRESEE, J. S.; TURCIOS, R.; FISCHER, T. K.; WIDDOWSON, M. A.; JIANG, B.; GENTSCH, J. R. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. **Lancet**, v. 368, p. 323–32, 2006.

GLEIZES, O.; DESSELBERGER, U.; TATOCHENKO, V.; RODRIGO, C.; SALMAN, N.; MEZNER, Z.; GIAQUINTO, C.; GRIMPREL, E. Nosocomial rotavirus infection in European countries: a review of the epidemiology, severity and economic burden of hospital-acquired rotavirus disease. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 25, p. S12-21, 2006.

GOMES, J. A.; NATES, S.; De CASTAGNARO, N. R.; ESPUL, C.; BORSA, A.; GLASS, R. I. Anticipating rotavirus vaccines: review of epidemiologic studies of rotavirus diarrhea in Argentina. **Rev. Panams. Saluds. Publica**, v. 3, p. 69-78, 1998.

GÓMEZ, M. M.; VOLOTAO, E. M.; LIMA DE MENDONÇA, L. F. L.; TORT, M. F. M.; LEITE, J. P. G. Detection of uncommon rotavirus A strains P[8]G8 and P[4]G8 in the city of Rio de Janeiro, 2002. **J. Med. Virol.**, v. 82, p. 1272-6, 2010.

GORZIGLIA, M.; NISHIKAWA, K.; HOSHINO, Y.; TANAGUCHI, K. Similarity of the outer capsid protein VP4 of the Gottfried strain of porcine rotavirus to that of asymptomatic human rotavirus strains. **J. Virol.**, v. 64, p. 414 - 8, 1990.

GOUVEA, V. b S.; DOMINGUES, A. L.; NAVECA, F. G.; PEDRO, A. R.; BEVILACQUA, C. C. Changing epidemiology of rotavirus-related hospitalizations in Rio de Janeiro, Brazil, from 2001 to 2006. **Open Virol. J.**, v. 1, p. 47-50, 2007.

GOUVEA, V.; BRANTLY, M. Is rotavirus a population of reassortants? **Trends Microbiol.**, v. 3, p. 159-62, 1995.

GOUVEA, V.; ALLEN, J. R.; GLASS, R. I.; FANG, Z.; BREMONT, M.; COHEN, J.; MCCRAE, M. A.; SAIF, L.; SINARACHATANANT, P.; CAUL, E.O. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 519-23, 1991.

GOUVEA, V.; HO, M.; GLASS, R. I.; WOODS, P.; FORRESTER, P.; ROBINSON, C.; ASHLEY, R.; RIEPENHOFF-TALTY, M., CLARK, H. F., TANIGUCHI, K., MEDDIX, E., MCKELLAR, B., PICKERING, L. Serotypes and electrophoretotypes of human rotavirus in the USA: 1987-1989. **J. Infect. Dis.**, v. 162, p. 362-7, 1990a.

GOUVEA, V.; CASTRO, L.; TIMENETSKY, M. C.; GREENBERG, H.; SANTOS, N. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 1408-9, 1994a.

GOUVEA, V.; GLASS, R. I.; WOODS, P.; TANIGUCHI, K.; CLARK, H. F.; FORRESTER, B.; FANG, Z.Y. Polymerase Chain Reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 276-82, 1990b.

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M.C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 1333 - 7, 1994b.

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M. C. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 1338-40, 1994c.

GREEN, K. Y.; TANIGUCHI, K.; MACKOW, E. R.; KAPIKIAN, A. Z. Homotypic and heterotypic epitope-specific antibody responses in adult and infant rotavirus vaccines: implications for vaccine development. **J. Infect. Dis.**, v. 161, p. 667-79, 1989.

GREENBERG, H.; MCAULIFFE, V.; VALDESUSO, J.; WYATT, R.; FLORES, J.; KALICA, A.; HOSHINO, Y.; SINGH, N. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. **Infect. Immun.**, v. 39, p. 91-9, 1983.

GRIFFIN, D. D.; FLETCHER, M.; LEVY, M. E.; CHING-LEE, M.; NOGAMI, R.; EDWARDS, L.; PETERS, H.; MONTAGUE, L.; GENTSCH, J. R.; GLASS, R. I. Outbreaks of adult gastroenteritis traced to a single genotype of rotavirus. **J. Infect. Dis.**, v.185, n. 10, p. 1502-5, 2002.

GUANDALINI, S. J. Probiotics for children with diarrhea: an update. **Clin. Gastroenterol.**, v. 42, n. 2, p. S53-7, 2008.

GUINDON, S.; LETHIEC, F.; DUROUX, P.; GASCUEL O. PHYML Online – a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. **Nucleic Acids. Res.**, v. 33, p. 557-9, 2005.

GURGEL, R. G.; BOHLAND, A. K.; VIEIRA, S. C.; OLIVEIRA, D. M.; FONTES, P. B.; BARROS, V. F.; RAMOS, M. F.; DOVE, W.; NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O.; CORREIA, J. B.; CUNLIFFE, N.; CUEVAS, L. E. Incidence of rotavirus and all-cause diarrhea in northeast Brazil following the introduction of a national vaccination program. **Gastroenterology**, v. 137, n. 6, p. 1970-5, 2009.

GURGEL, R. Q.; CUNLIFFE, N. A.; NAKAGOMI, O.; CUEVAS, L. E. Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: a review. **J Clin**

Virol., v. 43, n. 1, p. 1-8, 2008.

GURGEL, R. Q.; CUEVAS, L. E.; VIEIRA, S. C. F.; BARROS, V. C. F.; FONTES, P. B.; SALUSTINO, E. F.; NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T.; DOVE, W.; CUNLIFFE, N.; HART, C.A. Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 13, p. 1571-3, 2007.

GUSMÃO, R. H.; MASCARENHAS, J. D.; GABBAY, Y. B.; LINS-LAINSON, Z.; RAMOS, F. L.; MONTEIRO, T. A.; VALENTE, S. A.; LINHARES, A. C. Rotaviruses as a cause of nosocomial, infantile diarrhoea in northern Brazil: pilot study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 90, n. 6, p. 743-9, 1995.

GUTIÉRREZ-GIMENO, M. V.; MARTIN-MORENO, J. M.; DÍEZ-DOMINGO, J.; ASENSI-BOTET, F.; HERNÁNDEZ-MARCO, R.; CORRECHER-MEDINA, P.; SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Nosocomial rotavirus gastroenteritis in Spain: a multicenter prospective study. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 29, p. 23-7, 2010.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids. Symp. Ser.**, v. 41: p. 95-8, 1999.

HASING, M.E.; TRUEBA, G.; BAQUERO, M.I.; PONCE, K.; CEVALLOS, W.; SOLBERG, O.D. EISENBERG, J.N. Rapid changes in rotaviral genotypes in Ecuador. **J. Med. Virol.**, v. 81, n. 12, p. 2109-13, 2009.

HEDBERG, C. W.; OSTERHOLM, M. T. Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 6, p. 199-210, 1993.

HERRING, A. J.; INGLES, N. F.; OJEN, C. K.; SNODGRASS, D. R.; MENZIES, J. D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **J. Clin. Microbiol.**, v. 16, p. 473-7, 1982.

HO, M. S.; GLASS, R. I.; PENBKY, P. F.; ANDEUSON, L. Rotavirus as a cause of diarrheal morbidity and mortality in the United States. **J. Infect. Dis.**, v. 158, p. 1112-6, 1988.

HODES, H.L. Viral gastroenteritis. **Am. J. Dis. Child.**, v. 131, p. 729-31, 1977.

HONG, S. K.; LEE, S. G.; LEE, S. A.; KANG, J. H.; LEE, J. H.; KIM, J. H.; KIM, D. S.; KIM, H. M.; JANG, Y. T.; MA, S. H.; KIM, S. Y.; PAIK, S. Y. Characterization of a G11,P[4] strain of human rotavirus isolated in South Korea. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 3759-61, 2007.

HONMA, S.; CHIZHIKOV, V.; SANTOS, N.; TATSUMI, M.; TIMENETSKY, M. do C.; LINHARES, A. C.; MASCARENHAS, J. D.; USHIJIMA, H.; ARMAH, G. E.; GENTSCH, J. R.; HOSHINO, Y. Development and validation of DNA microarray for genotyping group A rotavirus VP4 (P[4], P[6], P[8], P[9], and P[14]) and VP7(G1 to G6, G8 to G10, and G12) genes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 2641-8, 2007.

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

HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A. Z. Rotavirus antigens. In: RAMING, R.F. ed. Rotaviruses. **Berlin: Springer - Verlag**, p.180-227, 1994a.

HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A. Z. Rotavirus vaccine development for the prevention of severe diarrhea in infant and young children. **Trends Microbiol.**, v. 2, p. 242-9, 1994b.

HOSHINO, Y.; SERENO, M.; MIDTHUN, K.; FLORES, J.; KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R.M. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 82, p. 8701-4, 1985.

HUA, J.; CHEN, X.; PATTON, J. T. Deletion mapping of the rotavirus metalloprotein NS53 (NSP1): the conserved cysteine-rich region is essential for virus-specific RNA binding. **J. Virol.**, v. 68, n. 6, p. 3990-4000, 1994.

HUNG, T.; CHEN, G.; WANG, C.; YAO, H.; FANG, Z.; CHAO, T.; CHOU, Z.; YE, W.; CHANG, X.; DEN, S.; LIONG, X.; CHANG, W. Waterborne outbreak of rotavirus diarrhea in adults in China caused by a novel rotavirus. **Lancet**, v. 1, p. 1139 - 42, 1984.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ E CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA "Professor Alexandre Vranjac". Diarréia e Rotavírus. **Rev. Saude Públ. São Paulo**, v. 38, p. 844-5, 2004.

ISHAK, R.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y.; ISHAK, M. O. G.; CARDOSO, D. D. P. Soroepidemiologia de rotavírus em uma população infantil, Goiânia, Goiás, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 26, p. 280-4, 1984.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; ISHERWOOD, B.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. Reassortment *in vivo*: driving for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. **J. Virol.**, v. 75, p. 3696-3705, 2001.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; WONG, C.; BLOME, S.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **J. Virol.**, v. 76, p. 6596-601, 2002.

JIANG, B.; DENNEHY, P. H.; SPANGENBERGER, S.; GENTSCH, J. R.; GLASS, R. I. First detection of group C rotavirus in fecal specimens of children with diarrhea in the United States. **J. Infect. Dis.**, v. 172, p. 45-50, 1995.

JIN, Q.; WARD, R. L.; KNOWLTON, D. R.; GABBAY, Y. B.; LINHARES, A. C. RAPPAPORT, R.; WOODS, P. A.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J.R. Divergence of VP7 genes of G1 rotaviruses isolated from infants vaccinated with reassortant rhesus rotaviruses. **Arch. Virol.**, v. 141, p. 2057-76, 1996.

KALICA, A. R.; SERENO, M. M.; WYATT, R. G.; MEBUS, C. A.; CHANOCK, R. M.; KAPIKIAN, A. Z. Comparison of human and animal rotavirus strains by gel electrophoresis of viral RNA. **Virology**, v. 87, p. 247-55, 1978.

KALICA, A. R.; PURCELL, R. H.; SEREWNO, M. M.; WYATT, R. G.; KIM, H. W.; CHANOCK, R. M.; KAPIKIAN, A. Z. A microtiter solid phase radioimmunoassay for detection of the human reovirus-like agent in stools. **J. Immunol.**, v. 118, p. 1275-9, 1977.

KANE, E. M.; TURCIOS, R. M.; ARVAY, M. L.; GARCIA, S.; BRESEE, J. S.; GLASS, R. I. The epidemiology of rotavirus diarrhea in Latin America. Anticipating rotavirus vaccines. **Rev. Panam. Salud. Publica**, v. 16, n. 6, p. 371-7, 2004.

KAPAHNKE, R.; RAPPOLD, W.; DESSELBERGER, U.; RIESNER, D. The stiffness of dsRNA: hydrodynamic studies on fluorescence-labelled RNA segments of bovine rotavirus. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 14, p. 3215-28, 1986.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, editors. **Fields Virology**. 4th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins;. p.1787-833, 2001.

KAPIKIAN, A.Z.; HOSHINO, Y. To serotype or not to serotype: that is still the question. **Infect. Dis.**, 195:611-4, 2007.

KAPIKIAN, A. Z.; SIMONSEN, L.; VESIKARI, T.; HOSHINO, Y.; MORENS, D. M.; CHANOCK, R. M. A hexavalent human rotavirus-bovine rotavirus (UK) reassortant vaccine designed for use in developing countries and delivered in a schedule with the potential to eliminate the risk of intussusception. **J. Infect. Dis.**, v. 192, p. S22-9, 2005.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R. M.; PEREZ-SCHAEL, I. Jennerian and modified Jennerian approach to vaccination against rotavirus diarrhea using a quadrivalent rhesus rotavirus (RRV) and human-RRV reassortant vaccine. **Arch. Virol.**, v. 12, p. 163-75, 1996.

KAPIKIAN, A. Z., WYATT, R. G., DOLIN, R., THORNHILL, T. S., KALICA, A. R.; CHANOCK, R. M. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infections nonbacterial gastroenteritis. **J. Virol.**, v. 10, p. 1075-81, 1972.

KIRKWOOD, C. D.; BONIFACE, K.; BISHOP, R. F.; BARNES, G. L.; Australian Rotavirus Surveillance Group Australian Rotavirus Surveillance Program annual report, 2008/2009. Kirkwood. **Commun. Dis. Intell.**, v. 33, n. 4, p. 382-8, 2009.

KIRKWOOD, C. D.; BOGDANOVIC-SAKRAN, N.; CLARK, R.; MASENDY CZ, P.; BISHOP, R.; BARNES, G. Report of the Australian Rotavirus Surveillance Program, 2001/2002. **Commun. Dis. Intell.**, v. 26, n. 4, p. 537-40, 2002.

KOBAYASHI. N.; NAIK T. N.; KUSUHARA, Y.; KRISHNAN, T.; SEN, A.; BHATTACHARYA, S. K.; TANIGUCHI, K.; ALAM, M. M.; URASAWA, T.; URASAWA, S. Sequence analysis of genes encoding structural and nonstructural proteins of a human group B rotavirus detected in Calcutta, India. **J. Med. Virol.**, v. 64, n. 4, 4. P. 583-8, 2001.

KOOPMAN, J. S.; MONTO, A. S.; LONGINI, I. M. Jr. The Tecumesh study: family and community sources of rotavirus infection. **Am. J. of Epidemiol.**, v. 130, p. 760-8, 1989.

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R. L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull. W.H.O.**, v. 81, p. 197-204, 2003.

KRISHNAN, T.; SEN, A.; CHOUDHURY, J. S.; DAS, S.; NAIK, T. N.; BHATTACHARYA, S. K. Emergence of adult diarrhoea rotavirus in Calcutta, India. **Lancet**, v. 353, p. 380-1, 1999.

LANATA, C. F.; FRANCO, M. Nitazoxanide for rotavirus diarrhoea? **Lancet**, v. 368, p. 100-1, 2006.

LANZIERI, T. M.; COSTA, I.; SHAFI, F. A.; CUNHA, M. H.; ORTEGA-BARRIA, E.; LINHARES, A. C.; COLINDRES, R. E. Trends in hospitalizations from all-cause gastroenteritis in children younger than 5 years of age in Brazil before and after human rotavirus vaccine introduction, 1998-2007. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 29, n. 7, p. 673-5, 2010.

LARRALDE, G.; LI, B. G.; KAPIKIAN, A. Z.; GORZIGLIA, M. Serotype-specific epitope(s) present on the VP8 subunit of rotavirus VP4 protein. **J. Virol.**, v. 65, p. 3213-8, 1991.

LAWTON, J. A.; ZENG, C. Q.; MUKHERJEE, S. K.; COHEN, J.; ESTES, M. K.; PRASAD, B. V. Three-dimensional structural analysis of recombinant rotaviruslike particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer. **J. Virol.**, v. 71, p. 7353-60, 1997.

LE BARON, C. W.; FURUTAN, N. P.; LEW, J. F.; ALLEN, J. R.; GOUVEA, V.; MOE, C.; MONROE, S. S. Viral agents of gastroenteritis. **M.M.W.R.**, v. 39, p. 1-24, 1990.

LEITE, J. P. G.; CARVALHO-COSTA, F. A.; LINHARES, A. C. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 745-53, 2008.

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

LEVETT, P. N.; GU, M.; LUAN, B.; FEARON, M.; STUBBERFIELD, J.; JAMUSON, F.;

PETRIC, M. Longitudinal study of molecular epidemiology of small round structured viruses in a pediatric population. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 1497-501, 1996.

LI, Z.; BAKER, M. L.; JIANG, W.; ESTES, M. K.; PRASAD, B. V. Rotavirus architecture at subnanometer resolution. **J. Virol.**, v. 83, n. 4, p. 1754-66, 2009.

LI, B.; CLARK, H. F.; GOUEVA, V. Nucleotide sequence of the VP4 - encoding gene of an unusual human rotavirus (HCR 3). **Virology**, v. 196, p. 825-30, 1993.

LIGHT, J. S.; HODES, H. L. Studies on epidemic diarrhea of the newborn: isolation of a filtrable agent causing diarrhea in calves. **Am. J. Public Health.**, v. 33, p. 1451 - 4, 1943.

LINHARES, A. C.; BREESE, J. S. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 8, p. 305-31, 2000.

LINHARES, A. C.; MASCARENHAS, J. D.; GUSMÃO, R. H.; GABBAY, Y. B.; FIALHO, A. M.; LEITE, J. P. G. Neonatal rotavirus infection in Belém, northern Brazil: nosocomial transmission of a P[6] G2 strain. **J. Med. Virol.**, v. 67, p. 418-26, 2002.

LINHARES, A. C.; RUIZ-PALACIOS, G. M.; GUERRERO, M. L.; SALINAS, B.; PEREZ-SCHAEL, I.; CLEMENS, A. S. A short report on highlights of world-wide development of RIX4414: a Latin American experience. **Vaccine**, v. 24, n. 18, p. 3784-5, 2006a.

LINHARES, A. C.; VERSTRAETEN, T.; WOLLESWINKEL-VAN DEN BOSCH, J.; CLEMENS, R.; BREWER, T. Rotavirus serotype G9 is associated with more-severe disease in Latin America. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 3, p. 312-4, 2006b.

LINHARES, A.C. Rotavirus infection in Brazil: epidemiology and challenges for its control. **Cad. Saúde. Publica**, v. 16, p. 629-46, 2000.

LINHARES, A. C.; FERREIRA, F. S.; MAUES, B. C.; BENCHIMOL, J. A.; GABBAY, Y. B. Prevalência de anticorpos para rotavírus em crianças diarreicas de Belém, Brasil. **Rev. Fundação.SESP**, v. 28, p. 95-105, 1983.

LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; MASCARENHAS, J. D. P.; FREITAS, R. B.; FLEWETT, T. H.; BEARDS, G. M. Epidemiology of rotavirus subgroups and serotypes in

Belem, Brazil: a three-year study. **Ann. Inst. Pasteur Virol.**, v. 139, p. 89-99, 1988.

LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; FREITAS, R. B.; GABBAY, Y. B.; SHIRLEY, J. A.; BEARDS, G. M. An outbreak of rotavirus diarrhea among a nonimmune, isolated South American indian community. **Am. J. Epidemiol.**, v. 113, p. 703-10, 1981.

LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; SCHMETZ, C.; MULLER, G.; PETERS, D. Duovirus (rotavírus) em Belém do Pará, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 19, p. 278-9, 1977.

LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; FREITAS, R. B.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; MASCARENHAS, J. D.; LOUREIRO, E. C. B. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. **Epidemiol. Infect.**, v. 102, p. 129-44, 1989.

LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; MASCARENHAS, J. D.; DE FREITAS, R. B.; OLIVEIRA, C. S.; BELLESI, N.; MONTEIRO, T. A.; LINS-LAINSON, Z.; RAMOS, F. L.; VALENTE, S. A. Immunogenicity, safety and efficacy of rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belém, Brazil. **Bull W.H.O.**, v.74, p. 491-500, 1996.

LIU, M.; MATTION, N. M.; ESTES, M. K. Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. **Virology**, v. 188, p. 77-84, 1992.

LOURENÇO, M. H.; NICOLAS, J. C.; COHEN, J.; SCHERRER, R.; BRICOUT, F. Study of human rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. **Ann. Virol. Inst. Pasteur**, v. 132, p. 161 - 73, 1981.

LUCHS, A.; MORILLO, S. G.; KISIELIUS, J. J.; UEDA, M.; CARMONA, R. C.; TIMENETSKY, M. C. Group C rotavirus, detection in Southeastern Brazil after 15 years. **J. Clin. Virol.**, v. 46, p. 389-90, 2009.

LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. **Microbes. Infect.**, v. 3, p. 1145-56, 2001.

LUNDGREN, O.; TIMAR-PEREGRIN, A.; PERSSON, K.; KORDASTI, S.; UHNOO, I.; SVENSSON, L. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. **Science**, v. 287, p. 491-5, 2000.

LUZ, C. R.; MASCARENHAS, J. D.; GABBAY, Y. B.; MOTTA, A. R.; LIMA, T. V.; SOARES, L. DA S.; LINHARES, A. C. Rotavirus serotypes and electropherotypes identified among hospitalised children in São Luís, Maranhão, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 47, n. 5, p. 287-93, 2005.

MACEDO, C. I.; CHRISTOFOLETTI, A.; MUNFORD, V.; RÁCZ, M. L. G and P rotavirus genotypes in stool samples from children in Teresina, State of Piauí. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n.4, p. 381-4, 2007.

MARTINI, I. J.; GENNARI, G. M.; MARTINS, S. S.; GOUVÊA, V. S.; GATTI, M. S. Changing distribution of human rotavirus serotypes during two epidemic outbreaks of gastroenteritis in Campinas, São Paulo, Brazil, 2003-2004: detection of G6 strains. **J. Clin. Virol.**, v. 43, p. 244-6, 2008.

MASCARENHAS, J. D. P.; LIMA, C.S.; DE OLIVEIRA, D. S.; GUERRA, S. DE F.; MAESTRI, R. P.; GABBAY, Y. B.; DE LIMA, I. C.; DE MENEZES, E. M.; LINHARES, A. C.; BENSABATH, G. Identification of two sublineages of genotype G2 rotavirus among diarrheic children in Parauapebas, Southern Pará State, Brazil. **J. Med. Virol.**, v. 82, n. 4, p. 712-9, 2010.

MASCARENHAS, J. D. P.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; LEITE, J. D. P. Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belém, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 113-7, 2002.

MASENDYCH, P.; BOGDANOVIC-SAKRAN, N.; PALOMBO, E.; BISHOP, R.; BARNES G. Annual report of the rotavirus surveillance program, 1999/2000. **Commun. Dis. Intell.**, v. 24, p. 195-8, 2000.

MATSUI, S. M.; OFFIT, P. A.; VO, P. T.; MACKOW, E. R.; BENFIELD, D. A.; SHAW, R. D.; PADILLA, N. L.; GREENBERG, H. B. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to the heterotypic neutralization domain of VP7 and VP8 fragment of VP4. **J. of Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 780-2, 1989.

MATSUNO, S.; UTAGAWA, E.; SUGIURA, A. Association of rotavirus infection with Kawasaki syndrome. **J. Infect. Dis.**, v. 148, n. 1, p. 177, 1983.

MATTHEWS, R. E. F. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meeting of the International Committee on Taxonomy of Viruses, The Hague. Sep. 1978. **Intervirology**, v. 11, p. 133-5, 1979.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H.; BANYAI, K.; ESTES, M.; GENTSCH, J. R.; ITURRIZA-GOMARA, M.; KIRKWOOD, C. D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P. P. C.; NAKAGOMI, O.; PATTON, J. T.; RUGGERI F. M.; SAIF, L. J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; DESSELBERGER, V.; RANST, M. V. Recommendation for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Arch. Virol.**, v. 153, p. 1621-9, 2008a.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; HEIMAN, E.; ARIJS, I.; DELBEKE, T.; MCDONALD, S. M.; PALOMBO, E. A.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; MAES, P.; PATTON, J. T.; RAHMAN, M.; VAN RANST, M. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. **J. Virol.**, v. 82, 3204-19, 2008b.

MATTION, N. M.; MITCHELL, D. B.; BOTH, G. W.; ESTES M. K. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. **Virology**, v. 181, p. 295-304, 1991.

MAUNULA, L.; VON BONSDORFF, C. H. Frequent reassortments may explain the genetic heterogeneity of rotaviruses: analysis of Finnish rotavirus strains. **J. Virol.**, v. 76, n. 23, p. 11793-800, 2002.

MAUNULA, L.; VON BONSDORFF, C. H. Short sequences define genetic lineages: phylogenetic analysis of group A rotaviruses based on partial sequences of genome segments 4 and 9. **J. Gen. Virol.**, v. 79, n. 2, p. 321-32, 1998.

MEBUS, C. A.; UNDERDAHL, N.R.; RHODES, M.B.; TWIEHAUS, M.J. Calf diarrhea (scours) reproduced with a virus from a field outbreak. **Nebraska Agric. Exp. St. Bull.**, v. 233, p. 1-16, 1969.

MIDTHUN, K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotavirus Vaccines: an Overview. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 9, p. 423-34, 1996.

MIKAMI, T.; NAKAGOMI, T.; TSUTSUI, R.; ISHIKAWA, K.; ONODERA, Y.; ARISAWA, K.; NAKAGOMI, O. An outbreak of gastroenteritis during school trip caused by serotype G2 group A rotavirus. **J. Med. Virol.**, v. 73, n. 3, p. 460-4, 2004.

MOGILNER, B. M.; SHANON, A. Necrotizing enterocolitis--a 5-year experience. **Isr. J. Med. Sci.**, v. 19, n. 11, p. 982-3, 1983.

MONTENEGRO, F. M.; CORREIA, J. B.; RODRIGUES FALBO, A.; DOVE, W.; NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O.; CUEVAS, L. E.; CUNLIFFE, N. A.; HART, C. A. Anticipating rotavirus vaccines in Brazil: detection and molecular characterization of emerging rotavirus serotypes G8 and G9 among children with diarrhoea in Recife, Brazil. **J. Med. Virol.**, v. 79, n. 3, p. 335-40, 2007.

MOREIRA, L. L.; NETTO, E. M.; NASCIMENTO-CARVALHO, C. M. Risk factors for nosocomial rotavirus infection in a paediatric hospital: the potential role for rotavirus vaccine use. **Vaccine**, v. 27, n. 3, p. 416-20, 2009.

MOULTON, L. H.; STAAT, M. A.; SANTOSHAM, M.; WARD, R. L. The protective effectiveness of natural rotavirus infection in an American Indian population. **J. Infect. Dis.**, v. 178, n. 6, p. 1562-6, 1998.

MRUKOWICZ, J.; SZAJEWSKA, H.; VESIKARI, T. Options for the prevention of rotavirus disease other than vaccination. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 46, p. S32-7, 2008.

MUNFORD, V.; SOUZA, E. C.; CARUZO, T. A. R.; MARTINEZ, M. B.; RÁCZ, M. L. Serological and molecular diversity of human rotavirus in São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, n. 3, p. 459-66, 2007.

MUNFORD, V.; GILIO, A. E.; DE SOUZA, E. C.; CARDOSO, D. M.; CARDOSO D. D.; BORGES, A. M.; COSTA, P. S.; MELGAÇO, I. A.; ROSA, H.; CARVALHO, P. R.; GOLDANI, M. Z.; MOREIRA, E. D. JR.; SANTANA, C.; EL KHOURY, A.; IKEDO, F.; RÁCZ, M. L. Rotavirus gastroenteritis in children in 4 regions in Brazil: a hospital-based surveillance study. **J. Infect. Dis.**, v. 200, p. S106-13, 2009.

MUNOS, M. K.; WALKER, C. L.; BLACK, R. E. The effect of rotavirus vaccine on diarrhoea mortality. **Int. J. Epidemiol.**, v. 39, p. i56-62, 2010.

MURPHY, T. V.; GARGIULLO, P. M.; MASSOUDI, M. S.; NELSON, D. B.; JUMAAN, A. O.; OKORO, C. A.; ZANARDI, L. R.; SETIA, S.; FAIR, E. L.; LEBARON, C.W.; SCHWARTZ, B.; WHARTON, M.; LIVINGOOD, J. R. Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. **New Engl. J. Med.**, v. 344, n. 8, p. 564-72, 2001.

NAGESHA, H. S.; HUANG, J.; HUM, C. P.; HOLMES, I. H. A porcine rotavirus strains with dual VP7 serotype specificity. **Virology**, v. 175, p. 319-22, 1990.

NAKAGOMI, T.; AKATANI, K.; IKEGAMI, N.; KATSUSHIMA, N.; NAKAGOMI, O. Occurrence of changes in human rotavirus serotypes with concurrent changes in genomic RNA electropherotypes. **J Clin Microbiol.**, v. 26, n. 12:2586-92, 1988.

NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T. Molecular evidence for naturally occurring single VP7 gene substitution reassortant between human rotaviruses belonging to two different genogroups. **Arch. Virol.**; v. 119, p. 67-81, 1991.

NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T. Interspecies transmission of rotaviruses studied from the perspective of genogroup. **Microbiol. Immunol.**, v. 37, p. 337-48, 1993.

NAKAGOMI, T.; CUEVAS, L. E.; GURGEL, R. G.; ELROKHSI, S. H.; BELKHIR Y.A.; ABUGALIA, M.; DOVE, W.; MONTENEGRO, F. M.; CORREIA, J. B.; NAKAGOMI, O.; CUNLIFFE, N. A.; HART, C. A. Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. **Arch. Virol.**, v. 153, n. 3, p. 591-3, 2008.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. GenBank [database]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 07 jan 2010.

NEWBURG, D. S.; PETERSON, J. A.; RUIZ-PALACIOS, G. M.; MATSON, D. O.; MORROW, A. L.; SHULTS, J.; GUERRERO, M. L.; CHATURVEDI, P.; NEWBURG, S. O.; SCALLAN, C. D.; TAYLOR, M. R.; CERIANI, R. L.; ICKERING, L. K. Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. **Lancet**, v. 351, n. 9110, p. 1160-4, 1998.

NICOLAS, J. C.; INGRAND, D.; FORTIER, B.; BRICOUT, F. A one-year virological survey of acute intussusception in childhood. **J. Med. Virol.**, v. 9, n. 4, p. 267-71, 1982.

NUNES, A. A.; DE MELLO, L. M.; PARRO DE, R. N.; BITTAR, J. P.; DOMINGUES, A. L. Prevalence of Rotavirus in Acute Diarrhea and its Association with Clinical Signs and Symptoms. **J. Trop. Pediatr.**, v. 56, n. 3, p. 212-3, 2009.

OFFIT, P. A.; BLAVAT, G. Identification of the two rotavirus genes determining neutralization specificities. **J. Virol.**, v. 57, p. 376-8, 1986.

OFFIT, P. A.; CLARK, H. F. Protection against rotavirus-induced gastroenteritis in a murine model by passively acquired gastroenintestinal but not circulating antibodies. **J.**

Virol., v. 54, p. 58-64, 1985.

OFFIT, P. A.; HOFFENBERG, E. J.; SANTOS, N.; GOUVEA, V. Rotavirus-specific humoral and cellular immune responses after primary, symptomatic infection. **J. Infect. Dis.**, v. 167, p. 1436-40, 1993.

O'RYAN, M.; PEREZ-SCHAEL, I.; MAMANI, N.; PENA, A.; SALINAS, B.; GONZALEZ, G.; MATSON, D. O.; GÓMEZ, J. Rotavirus-associated medical visits and hospitalizations in South America: a prospective study at three large sentinel hospitals. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 20, p. 685-93, 2001.

PALOMBO, E. A. Genetic analysis of Group A rotaviruses: evidence for interspecies transmission of rotavirus genes. **Virus Genes**, v. 24, p. 11-20, 2002.

PARASHAR, U. D.; BRESEE, J. S.; GLASS, R. I. The global burden of diarrhoeal disease in children. **Bull W.H.O.**, v. 81, p. 236, 2003.

PARASHAR, U. D.; GIBSON, C. J.; BRESEE, J. S.; GLASS, R. I. Rotavirus and severe childhood diarrhea. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, p. 304-6, 2006.

PARRA, G. I.; ESPÍNOLA, E. E.; AMARILLA, A. A.; STUPKA, J.; MARTINEZ, M.; ZUNINI, M.; GALEANO, M. E.; GOMES, K.; RUSSOMANDO, G.; ARBIZA, J. Diversity of group A rotavirus strains circulating in Paraguay from 2002 to 2005: detection of an atypical G1 in South America. **J. Clin. Virol.**, v. 40, n. 2, p. 135-41, 2007.

PARRA, G. I.; BOK, K.; MARTÍNEZ, V.; RUSSOMANDO, G.; GÓMEZ, J. Molecular characterization and genetic variation of the VP7 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay. **J. Med. Virol.**, v. 77, n. 4, p. 579-86, 2005.

PATTON, J. T., SILVESTRI, L. S.; TORTORICI, M. A.; VASQUEZ-DEL CARPIO, R.; TARAPOREWALA, Z. F. Rotavirus genome replication and morphogenesis: role of the viroplasm. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 309, p. 169-87, 2006.

PATTON, J. T., JONES, M. T.; KALBACH, A. N.; HE, Y. W.; XIAOBO, J. Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. **J. Virol.**, v. 71, p. 9618-26, 1997.

PATTON, J. T. Synthesis of simian rotavirus SA11 double-strand RNA in a cell free system. **Virus Res.**, v. 6, p. 217-33, 1986.

PAULKE-KORINEK, M.; RENDI-WAGNER, P.; KUNDI, M.; KRONIK, R.; KOLLARITSCH, H. Universal mass vaccination against rotavirus gastroenteritis: impact on hospitalization rates in austrian children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 29, n. 4, p. 319-23, 2010.

PEÑARANDA, M. E.; CUBITT, W. D.; SINARACHATANANT, P.; TAYLOR, D. N.; LIKANONSAKUL, S.; SAIF, L.; GLASS, R. I. Group C rotavirus infections in patients with diarrhea in Thailand, Nepal, and England. **J. Infect. Dis.**, v. 160, p. 392-7, 1989.

PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J. P. G.; CANDEIAS, J. A. N.; RÁCZ, M. L.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; TRABULSI, L. R. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. **J. Hyg. Camb.**, v. 90, p. 117-25, 1983a.

PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; SUTMOLLER, F.; LEITA, J. P. G.; FARIAS, U. de; BARTH, O.M.; VIDAL, M.N.P. Comparasion of polyacrilamide gel electrophoreses (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 78, p. 483-90, 1983b.

PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J. P. G.; ANDRADE, Z. P.; DE CASTRO, L. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). **J. Virol. Methods.**, v. 10, p. 21-8, 1985.

PEREIRA, H. G.; LINHARES, A. C.; CANDEIAS, J. A. N.; GLASS, R.I. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil: **Bull. Pan. Am. Health Organ.**, v. 27, p. 224-33, 1993.

PESAVENTO, J. B.; CRAWFORD, S. E.; ESTES, M. K.; PRASAD, B. V. Rotavirus proteins: structure and assembly. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 309, p. 189-219, 2006.

PHAN, T. G.; OKITSU, S.; MANEEKARN, N.; USHIJIMA, H. Evidence of intragenic recombination in G1 rotavirus VP7 genes. **J. Virol.**, v. 81, n.18, p. 10188-94, 2007.

PHAN, T. G.; NISHIMURA, S.; OKAME, M.; NGUYEN, T. A.; KHAMRIN, P.; OKITSU, S.; MANEEKARN, N.; USHIJIMA, H. Virus diversity and an outbreak of group C rotavirus among infants and children with diarrhea in Maizuru city, Japan during 2002-2003. **J. Med. Virol.**, v. 74, n. 1, p. 173-9, 2004.

PICKERING, L. K.; BARTLETT, A. V.; REVES, R. R.; MORROW, A. Assymptomatic excretion of rotavirus before and after rotavirus diarrhea in children in day care center. **J. Pediatr.**, v. 112, p. 361-5, 1988.

PIETRUCHINSKI, E.; BENATI, F.; LAURETTI, F.; KISIELIUS, J.; UEDA, M.; VOLOTÃO, E. M.; SOARES, C. C.; HOSHINO, Y.; LINHARES, R. E.; NOZAWA, C.; SANTOS, N. Rotavirus diarrhea in children and adults in a southern city of Brazil in 2003: distribution of G/P types and finding of a rare G12 strain. **J. Med. Virol.**, v. 78, p. 1241-9, 2006.

PIETSCH, C.; LIEBERT, U. G. Human infection with G12 rotaviruses, Germany. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 15, n. 9, p. 1512-5, 2009.

PODKOLZIN, A. T.; FENSKE, E. B.; ABRAMYCHEVA, N. Y.; SHIPULIN, G. A.; SAGALOVA, O. I.; MAZEPA, V. N.; IVANOVA, G. N.; SEMENA, A. V.; TAGIROVA, Z. G.; ALEKSEEVA, M. N.; MOLOCHNY, V. P.; PARASHAR, U. D.; VINJÉ, J.; MALEEV, V. V.; GLASS, R. I.; POKROVSKY, V. I. Hospital-based surveillance of rotavirus and other viral agents of diarrhea in children and adults in Russia, 2005-2007. **J. Infect. Dis.**, v. 1, p. S228-33, 2009.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817-8, 1998.

PRASAD, B. V.; BURNS, J. W.; MARIETTA, E.; ESTES, M. K.; CHIU, W. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. **Nature**, v. 343, p. 476-9, 1990.

PRASAD, B.V.; CHIU, W. Structure of rotavirus. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, 185:9-29, 1994.

RAHMAN, M.; BANIK, S.; FARUQUE, A. S.; TANIGUCHI, K.; SACK, D. A.; VAN RANST, M.; AZIM, T. Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 4460-5, 2005a.

RAHMAN, M.; MATTHIJNSSENS, J.; NAHAR, S.; PODDER, G.; SACK, D. A.; AZIM, T.; VAN RANST, M. Characterization of a novel P[25], G11 human group a rotavirus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 3208-12, 2005b.

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

RAMIG, R. F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **J. Virol.**, v. 78, p. 10213-20, 2004.

RHEINGANS, R. D.; CONSTENLA, D.; ANTIL, L.; INNIS, B. L.; BREUER, T. Potential cost-effectiveness of vaccination for rotavirus gastroenteritis in eight Latin American and Caribbean countries. **Rev. Panam. Salud. Publica**, v. 21, p. 205-16, 2007.

RIBEIRO, L. R.; GIUBERTI, R. S.; BARREIRA, D. M.; SAICK, K. W.; LEITE, J. P. G. MIAGOSTOVICH, M. P.; SPANO, L. C. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 2, p. 201-6, 2008.

RICHARDSON, V.; HERNANDEZ-PICHARDO, J.; QUINTANAR-SOLARES, M.; ESPARZA-AGUILAR, M.; JOHNSON, B.; GOMEZ-ALTAMIRANO, C. M.; PARASHAR, U.; PATEL, M. Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. **N. Engl. J. Med.**, v.62, n. 4, p. 299-305, 2010.

RODGER, S. M.; BISHOP, R. F.; HOLMES, I.H. Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant. **J. Clin. Microbiol.**, v. 16, p. 724-6, 1982.

ROSA E SILVA M. L.; NAVECA, F. G.; PIRES DE CARVALHO, I. Epidemiological aspects of rotavirus infections in Minas Gerais, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 5, n. 4, p. 215-22, 2001.

ROSA E SILVA, M. L.; PIRES DE CARVALHO, I.; GOUVEA, V. 1998-1999 rotavirus seasons in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil: detection of an unusual G3P[4] epidemic strain. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 8, 2837-42, 2002.

ROSSIGNOL, J. F.; KORBA, B. E.; KABIL, S. M. Nitazoxanide for treatment of severe rotavirus diarrhea: randomized double-blind placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 368, p. 124-9, 2006.

RUBILAR-ABREU, E.; HEDLUND, K.O.; SVENSSON, L.; MITTELHOLZER, C. Serotype G9 rotavirus infections in adults in Sweden. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 1374-6, 2005.

RUIZ-PALACIOS, G. M.; PERES-SCHAEEL, I.; VELÁSQUEZ, F. R.; ABATE, H.; BREUER, T.; CLEMENS, S. C.; CHEUVART, B.; ESPINOZA, F.; GILLARD, P.; INNIS, B. L.; CERVANTES, Y.; LINHARES, A. C.; LÓPEZ, P.; MACÍAS-PARRA, M.; ORTEGA-BARRÍA, E.; RICHARDSON, V.; RIVERA-MEDINA, D. M.; RIVERA, L.; SALINAS, B.; PAVÍA-RUZ, N.; SALMERÓN, J.; RÜTTIMANN, R.; TINOCO, J. C.; RUBIO, P.; NUÑEZ, E.; GUERRERO, M. L.; YARZÁBAL, J. P.; DAMASO, S.; TORNIEPORTH, N.; SÁEZ-LLORENS, X.; VERGARA, R.F.; VESIKARI, T.; BOUCKENOOGHE, A.; CLEMENS, R.; DE VOS, B.; O'RYAN, M. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, p. 11-22, 2006.

SAIF, L. J.; JIANG, B. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. In: **Rotaviruses**, edited by Ramig, R.F. Berlin: Springer-Verlag, 1994, p. 340-371.
SAITOH, Y.; MATSUNO, S.; MUKOYAMA, A. Exanthem subitum and rotavirus. **N. Engl. J. Med.**, v. 304, n. 14, p. 845, 1981.

SALINAS, B.; GONZALEZ, R.; ESCALONA, M.; MATERAN, M.; SACAEL, I. P. Epidemiological and clinical characteristics of rotavirus disease during Five years of surveillance in Venezuela. **Pediatric. Infect. Dis. J.**, v. 23, p. S161-167, 2004.

SÁNCHEZ-FAUQUIER, A.; ROMAN, E.; COLOMINA, J.; WILHELMI, I.; GLASS, R. I.; JIANG, B. First detection of group C rotavirus in children with acute diarrhea in Spain. **Arch. Virol.**, v. 148, n. 2, p. 399-404, 2003.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 74, p. 5463-7, 1977.

SANTOS, N.; VOLOTÃO, E. M.; SOARES, C. C.; ALBUQUERQUE, M. C. DA SILVA, F. M.; CHIZHIKOV, V.; HOSHINO, Y. VP7 gene polymorphism of serotype G9 rotavirus strains and its impact on G genotype determination by PCR. **Virus Res.**, v. 90, p. 1-14. Corrected and republished in: **Virus Res.**, v. 93, n. 1, 127-38, 2003.

SANTOS, N.; HONMA, S.; TIMENETSKY, M. DO. C.; LINHARES, A. C.; USHIJIMA, H.; ARMAH, G. E.; GENTSCH, J. R.; HOSHINO, Y. Development of a microtiter plate hybridization-based PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for identification of clinically relevant human group A rotavirus G and P genotypes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 462-9, 2008.

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

SANTOS, N.; LIMA, R. C.; PEREIRA, C. F.; GOUVEA, V. Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2727-9, 1998.

SANTOS, N.; VOLOTÃO, E. M.; SOARES, C. C.; ALBUQUERQUE, M. C. M.; SILVA, F. M.; CARVALHO, T. R. B.; PEREIRA, C. F. A.; CHIZHIKOV, V.; HOSHINO, Y. Rotavirus strains bearing genotype G9 or P[9] recovered from Brazilian children with diarrhea from 1997 to 1999. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 1157-60, 2001.

SANTOS, N.; VOLOTÃO, E. M.; SOARES, C. C.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I.; HOSHINO, Y. Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000 and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 4064-9, 2005.

SANTOS, N.; SOARES, C. C.; VOLOTÃO, E. M.; ALBUQUERQUE, M. C.; HOSHINO, Y. Surveillance of rotavirus strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 7, p. 3399-402, 2003.

SARTORI, A. M.; VALENTIM, J.; SOÁREZ, P. C.; NOVAES, H. M. Rotavirus morbidity and mortality in children in Brazil. **Rev. Panam. Salud. Pública**, v. 23, n. 2, p. 92-100, 2008.

SASTRY, N.; BURGARD, S. The prevalence of diarrheal disease among Brazilian children: Trends and differentials from 1986 to 1996. **Social Science and Medicine**, v. 60, p. 923-35, 2005.

SCHNAGL, R. D.; BONIFACE, K.; CARDWELL, P.; MCCARTHY, D.; ONDRACEK, C.; COULSON, B.; ERLICH, J.; MOREY, F. Incidence of group C human rotavirus in central Australia and sequence variation of the VP7 and VP4 genes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 2127-33, 2004.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. "Alexandre Vranjac". **Investigação de surtos. Normas e Instruções. Manual da Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por água e alimentos**, 2008.

Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/hidri_surto.htm>. Acesso em 04 de abr 2010.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. "Alexandre Franjac", **Informe Técnico. Rotavírus**, 2009. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/hidri_rotavirus.htm>. Acesso em 03 de mar 2010.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. "Alexandre Franjac", Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA), 2010. **Dados estatísticos. Surtos de doenças transmitidas por alimentos notificados ao CVE.** Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/hidri_estat.html. Acesso em: 03 de março 2010.

SHAW, A. L.; ROTHNAGEL, R.; CHEN, D.; RAMIG, R.F.; CHIU, W. Three-Dimensional Visualization of the Rotavirus Hemagglutinin Structure. **Cell**, v. 74, p. 693-701, 1993.

SMIRNOV, Y. A.; KAPITULETS, S. P.; AMITINA, N. N.; GINEVSKAYA, V. A.; KAVERIN, N. V. Effect of UV-irradiation on rotavirus. **Acta. Virol.**, v. 35, p.1-6, 1991.

SNELLING, T. L.; SCHULTZ, R.; GRAHAM, J.; ROSEBY, R.; BARNES, G. L.; ANDREWS, R. M.; CARAPETIS, J. R. Rotavirus and the indigenous children of the Australian outback: monovalent vaccine effective in a high-burden setting. **Clin. Infect. Dis.**, v. 49, n. 3, p. 428-31, 2009.

SOUZA, D. F.; KISIELIUS, J. J.; UEDA, M.; GABBAY, Y.B.; CARMONA, R. C.; TIMENETSKY, M. DO C. S. T.; MASCARENHAS, J. D.; TAKIMOTO, S.; TANAKA, H. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among adults living in Valentim Gentil, São Paulo State, Brazil. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, v. 16, p. 59-65,1998. Erratum in: **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, v. 16, n. 3, 1998.

SOUZA, M. B.; RACZ, M. L.; LEITE, J. P. G.; SOARES, C. M.; MARTINS, R. M.; MUNFORD, V.; CARDOSO, D. D. Molecular and serological characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Goiânia, Brazil, 1998-2000. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 22, p. 441-3, 2003.

SOUZA, E. C.; MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R.; MUKAI, L.; GILIO, A. E.; RACZ, M. L.; SILVA, L.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Etiologic profile of acute diarrhea in children in São Paulo. **J. Pediatr.**, v. 78, n. 1, p. 31-8, 2002.

STEELE, A. D.; PEENZE, I.; DE BEER, M. C.; PAGER, C. T.; YEATS, J.; POTGIETER, N.; RAMSAROOP, U.; PAGE, N. A.; MITCHELL, J. O.; GEYER, A.; BOS, P.; ALEXANDER, J. J. Anticipating rotavirus vaccines: epidemiology and surveillance of rotavirus in South Africa. **Vaccine**, v. 2, p. 354-60, 2003.

STEWIEN, K. E.; MEHNERT, D. U.; HARSI, C. M.; STEWIEN, E. T. D. M.; CANDEIAS, J. M. G.; TANAKA, K. Serotype and electrophoretotypes of human rotavirus detected in the city of São Luís (MA), Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 1355-61, 1994.

STEYER, A.; POLJSAK-PRIJATELJ, M.; BUFON, T.; SEDMAK, M.; VIDMAR, L.; MIJOVSKI, J. Z.; MARIN, J. First detection of group C rotavirus in patients with gastroenteritis in Slovenia. **J. Med. Virol.**, v. 78, p. 1250-5, 2006.

STUMOLLER, F.; AZEREDO, R. S.; LACERDA, M. D.; BARTH, O. M.; PEREIRA, H. G.; HOFFER, E.; SCHATZMAYR, H. G. An outbreak of gastroenteritis caused by both rotavirus and *Shigella sonnei* in private school in Rio de Janeiro. **J. Hyg.**, v. 88, p. 285 - 93, 1982.

SVENSSON, L.; SHESHBERADARAN, H.; VENE, S.; NORRBY, E.; GRANDIEN, M.; WADELL, G. Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. **J. Gen. Virol.**, v. 68, p. 643-51, 1987.

SZAJEWSKA, H.; DZIECHCIARZ, P. Gastrointestinal infections in the pediatric population. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 26, p. 36-44, 2010.

SZUCS, G.; KENDE, M.; UJ, M. Atypical human rotaviruses in Hungary. **Ann. Inst. Pasteur Virol.**, v. 138, p. 391-5, 1987.

TABASSUM, S.; SHEARS, P.; HART, C. A. Genomic characterization of rotavirus strains obtained from hospitalized children with diarrhoea in Bangladesh. **J. Med. Virol.**, v. 43, p. 50-6, 1994.

TANIGUCHI, K.; URASAWA, S. **Diversity in rotavirus genomes.** In: Seminars in Virology, v. 6, p. 123-31, 1995.

TANIGUCHI, K.; NISHIKAWA, K.; URASAWA, T.; URASAWA, S.; MIDTHUN, K.; KAPIKIAN, A. Z.; GORZIGLIA, M. Complete nucleotide sequence of the gene encoding VP4 of a human rotavirus strain (strain K8) which has unique VP4 neutralization epitopes.

J. Virol., v. 63, p. 4101 - 6, 1989.

TANIGUCHI, K. T.; URASAWA, T.; KOBAYASHI, N.; GORZIGLIA, M.; URASAWA, S. Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I and long RNA pattern: Implication for new G serotype specificity. **J. Virol.**, v. 64, p. 5640-4, 1990.

TATTE, V. S.; GENTSCH, J. R.; CHITAMBAR, S. D. Characterization of group A rotavirus infections in adolescents and adults from Pune, India: 1993-1996 and 2004-2007. **J. Med. Virol.**, v. 82, p. 519-27, 2010.

TEIXEIRA, J. M.; CAMARA, G. N.; PIMENTEL, P. F.; FERREIRA, M. N.; FERREIRA, M. S.; ALFIERI, A. A.; GENTSCH, J. R.; LEITE, J. P. Human group C rotavirus in children with diarrhea in the Federal District. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 1397-403, 1998.

TERAN, C. G.; TERAN-ESCALERA, C. N.; VILLARROEL, P. Nitazoxanide vs. probiotics for the treatment of acute rotavirus diarrhea in children: a randomized, single-blind, controlled trial in Bolivian children. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 13, n. 4, p. 518-23, 2009.

THOMAS, E. E.; ROSCOE, D. L.; BOOK, L.; BONE, B.; BROWN, L.; MAH, V. The utility of latex agglutination assays in the diagnosis of pediatric viral gastroenteritis. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 101, p. 742-6, 1994.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, n. 24, p. 4876-82, 1997.

TIAN, P.; HU, Y.; SCHILLING, W. P.; LINDSAY, D. A.; EIDEN, J.; ESTES, M. K. The nonstructural glycoprotein of rotavirus affects intracellular calcium levels. **J. Virol.**, v. 68, p. 251-7, 1994.

TIMENETSKY, M. C. S.; GOUVEA, N.; SANTOS, N.; ALGE, M. E.; KISIELLIUS, J.J.; CARMONA, R. C. C. Outbreak of severe gastroenteritis in adults and children associated with type G2 rotavirus. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, v. 14, p. 71-4, 1996.

TIMENETSKY, M. C. S.; SANTOS, N.; GOUVEA, N. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 2622 - 4, 1994.

TIMENETSKY, M. C. S. T.; GOUVEA, V.; SANTOS, N.; CARMONA, R. C. C.; HOSHINO, Y. A novel human rotavirus serotype with dual G5/G11 specificity. **J. Gen. Virol.**, v. 78, p. 1373-8, 1997.

TIMENETSKY, M. C. S. T.; KISIELLIUS, J. J.; GRISI, S. J. F. E.; ESCOBAR, A. M. U.; UEDA, M.; TANAKA, H. Rotavírus, Adenovírus, Astrovírus, Calicivírus e "Small Round Virus Particles" em fezes de crianças, com e sem diarreia aguda no período de 1987 a 1988, na Grande São Paulo. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 35, p. 275-80, 1993.

TOPKAYA, A. E.; AKSUNGAR, B.; ÖZAKKAFL, F.; ÇAPAN, N. Examination of rotavirus and enteric adenovirus in children with acute gastroenteritis. **Türk. Mikrobiyol. Cem. Derg.**, v. 36, n. 4, p. 210-3, 2006.

TRINH, Q. D.; NGUYEN, T. A.; PHAN, T. G.; KHAMRIN, P.; YAN, H.; HOANG, P. L.; MANEEKARN, N.; LI, Y.; YAGYU, F.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Sequence analysis of the VP7 gene of human rotavirus G1 isolated in Japan, China, Thailand, and Vietnam in the context of changing distribution of rotavirus G-types. **J. Med. Virol.**, v. 79, n. 7, p. 1009-16, 2007.

USHIJIMA, H.; HONMA, H.; MUKOYAMA, A.; SHINOSAKI, T.; FUJITA, Y.; KOBAYASHI, M.; OHSETO, M.; MORIKAWA; KITAMURA, T. Detection of group C rotaviruses in Tokyo. **J. Med. Virol.**, v. 27, p. 299-303, 1989.

VELÁZQUEZ, F. R.; MATSON, D. O.; CALVA, J. J.; GUERRERO, L.; MORROW, A. L.; CARTEL-CAMPBELL, S.; GLASS, R. I.; ESTES, M. K.; PICKERING, L. K.; RUIZPALACIOS, M. R. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. **N. Engl. J. Med.**, v. 335, p. 1022-8, 1996.

VENDE, P.; TARAPOREWALA, Z. F.; PATTON, J. T. RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. **J. Virol.**, v. 76, p. 5291-9, 2002.

VESIKARI, T.; ISOLAURI, E.; D'HONDT, E.; DELEM, A.; ANDRÉ, F. E.; ZISSIS, G. Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. **Lancet**, v. 1, p. 977-81, 1984.

VESIKARI, T.; JOENSUU, J. Review of rotavirus vaccine trials in Finland. **J. Infect. Dis.**, v. 174, n. 1, p. S81-7, 1996.

VESIKARI, T.; MATSON, D. O.; DENNEHY, P.; VAN DAMME, P.; SANTOSHAM M, RODRIGUES, Z.; DALLAS, M.J.; HEYSE, J.F.; GOVEIA, M. G.; BLACK, S.B.; SHINEFIELD, H. R.; CHRISTIE, C. D. C.; YLITALO, S.; ITZLER, R. F.; COIA, M. L.; ONORAT, M. T.; ADEYI, B. A.; MARSHALL, G. S.; GOTHEFORS, L.; CAMPENS, D.; KARVONEN, A.; WATT, J. P.; O'BRIEN, K.L.; DINUBILE, M. J.; CLARK, H. F.; BOSLEGO, J. W.; OFFIT, P. A.; HEATON, P. M. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, p. 23-33, 2006.

VOLOTÃO, E. M.; SOARES, C. C.; MARANHÃO, A. G.; ROCHA, L. N.; HOSHINO, Y.; SANTOS, N. Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro-Brazil during 2000-2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities. **J Med Virol.**, v. 78, p. 263-72, 2006.

WALKER, C. L. F.; FONTAINE, O.; YUNG, M. W.; BLACK, R. E. Zinc and low osmolarity oral rehydration salts for diarrhoea: a renewed call to action. **Bull. W.HO.**, v. 87, p. 780-6, doi: 10.2471/BLT.08.058990, 2009.

WANG, Y. H.; KOBAYASHI, N.; ZHOU, D. J.; YANG, Z. Q.; ZHOU, X.; PENG, J. S.; ZHU, Z. R.; ZHAO, D. F.; LIU, M. Q.; GONG, J. Molecular epidemiologic analysis of group A rotaviruses in adults and children with Wuhan city, China, 2000–2006. **Arch. Virol.**, v. 152, p. 669-85, 2007.

WANG, J.; JIANG, X.; MADORE, H. P.; GRAY, J.; DESSELBERGER, V.; ANDO, T.; SETO, Y.; OISH, I.; LEW, J.F.; GREEN, K. Y.; ESTES, M. K. Sequence diversity of small round structured viruses in the norwalk virus group. **J. Virol.**, v. 68, p. 5982-90, 1994.

WARD, R. L.; NAKAGOMI, O.; KNOWLTON, D. R.; MCNEAL, M. M.; NAKAGOMI, T.; CLEMENS, J. D.; SACK, D. A.; SCHIFF, G. M. Evidence for natural reassortants of human rotaviruses belonging to different genogroups. **J. Virol.**, v. 64, p. 3219-25, 1990.

WARD, R.L. Mechanisms of protection against rotavirus in humans and mice. **J. Infect. Dis.**, v. 174, p. S51-8, 1996.

WARD, R.L. Mechanisms of protection against rotavirus in humans and mice. **J. Infec. Dis.**, Chicago, v. 174, p. S51-S58, 1996.

WELCH, S. K., CRAWFORD, S. E., ESTES, M. K. Rotavirus SA11 genome segment 11

protein is a nonstructural phosphoprotein. **J. Virol.**, v. 63, p. 3974-82, 1989.

WIDDOWSON, M. A.; MELTZER, M. I.; ZHANG, X.; BRESEE, J. S.; PARASHAR, U. D.; GLASS, R. I. Cost-effectiveness and potential impact of rotavirus vaccination in the United States. **Pediatrics**, v. 119, n. 4, p. 684-97, 2007.

WIDDOWSON, M. A.; VAN DOOMUN, G. J.; VAN DER POEL, W. H.; BOER, A. S.; MAHDI, U.; KOOPMANS, M. Emerging group A rotavirus and nosocomial outbreak of diarrhoea. **Lancet**, v. 356, n. 9236, p. 1161-2, 2000.

WILHELMI, I.; COLOMINA, J.; MARTÍN-RODRIGO, D.; ROMAN, E.; SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. New immunochromatographic method for rapid detection of rotaviruses in stool samples compared with standard enzyme immunoassay and latex agglutination techniques. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 20, n. 10, p. 741-3, 2001.

WILHELMI, I.; ROMAN, E.; SANCHEZ-FANQUIER, A. Viruses causing gastroenteritis. **Clin. Microbiol. Infection.**, v.9, n.4, p.247-262, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Oral rehydration salts (ORS): a new reduced osmolarity formulation. Disponível em: <http://www.who.int/child-adolescenthealth/New_Publications/NEWS/Statement.htm>. Acesso em 11 de nov 2009

WU, B.; MAHONY, J. B.; SIMON, G.; CHERNESKY, M. A. - Sensitive solid-phase immune electron microscopy double-antibody technique with gold-immunoglobulin G complexes for detecting rotavirus in cell culture and feces. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, P. 864-8, 1990.

YEAGER, M., BERRIMAN, J. A.; BAKER, T. S.; BELLAMY, A.R. Threedimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis. **Embo J.**, v. 13, p. 1011-8, 1994.

YEE, E. L.; JIANG, B.; KENDALL, R. S.; HUMPHREY, C.; GLASS, R. I. Group C rotavirus in a pediatric kidney transplant patient with diarrhea. **J. Clin. Virol.**, v. 36, n. 4, p. 306-8, 2006.

YOLKEN, R. H.; BARBOUR, B.; WYATT, R. G.; KALICA, A. R.; KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for identification of rotaviruses from different animal species. **Science**, v. 201, p. 259- 2, 1978.

YOLKEN, R. H.; WYATT, R. G.; KALICA, A. R.; KIM, H. W.; BRANDT, C. D.; PARROT, R. H.; KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Use of a free viral immunofluorescence assay to detect human reovirus-like agent in human stools. **Infect. Immun.**, v. 16, p. 467-70, 1977.

YOSHINAGA, M.; PH, T. G.; NGUYEN, T. A.; YAN, H.; YAGYU, F.; OKITSU, S.; MÜLLER, W. E.; USHIJIMA, H. Changing distribution of group A rotavirus G-types and genetic analysis of G9 circulating in Japan. **Arch. Virol.**, v. 151, n. 1, p. 183-92, 2006.

ZAHN, M.; MARSHALL, G. S. Clinical and epidemiological aspects of rotavirus infection. **Pediatr. Ann.**, v. 35, p. 23-8, 2006.

ZHENG, B. J.; MA, G. Z.; TAM, J. S. L.; LO, S. K. F.; HON, M.; LAM, B. C. C.; YEUNG, C. Y. The effects of maternal antibodies on neonatal rotavirus infection. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 10, n. 11, p. 865-8, 1991.

ANEXO A – Artigo publicado