SIMONE MACEDO RIBEIRO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO NEUTRALIZANTE E DA
REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTI-ROTAVÍRUS
G3P[2] E G9P[8] EM AMOSTRAS DE LEITE E
COLOSTRO HUMANOS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan, para
obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de concentração:
Biotecnologia

Orientadora: Dra. Milene Tino De
Franco

**São Paulo
2010**

RESUMO

Santos, S.M.R. Avaliação da ação neutralizante e da reatividade de anticorpos anti-rotavírus G3P[2] e G9P[8] em amostras de leite e colostro humanos. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

A diarreia por rotavírus tem sido umas das principais causas de mortalidade infantil. Pesquisas, que relatam a presença de IgA no leite e colostro humanos reativos com o rotavírus. Nosso objetivo foi avaliar a presença de anticorpos IgA anti-G3P[2] em amostras de leite e colostro e anti-G9P[8] em amostras de leite pela técnica de ELISA, verificar sua capacidade neutralizante e analisar a reatividade pelo “Immunoblotting. Todas as amostras apresentaram anticorpos detectados pelo ELISA e neutralização do vírus G3P[2] e G9P[8]. Não foi observada correlação entre os títulos de ELISA e os neutralizantes para G3P[2], mas para o sorotipo G9P[8] foi possível estabelecer uma correlação significativa. As amostras reconheceram frações do antígeno viral no ensaio de “Immunoblotting”, mas não foi possível estabelecer uma correlação entre altos títulos e alguma fração antigênica específica. Este trabalho fornece subsídios para avaliações das estratégias de vacinação.

Palavras-chave: Rotavírus. G3P[2]. G9P[8]. SIgA. Aleitamento materno. Neutralização.

ABSTRACT

Santos, S.M.R. Evaluation of neutralizing activity and antibodies reactivity anti-rotavirus G3P[2] and G9P[8] in human milk and colostrum samples. [Master thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

The rotavirus diarrhea is one of the main causes of infant mortality. Studies have shown the presence of IgA in milk and colostrum reactive with human rotavirus. Our aim was to evaluate the presence of IgA anti-G3P[2] in milk and colostrum samples and anti-G9P[8] in milk ones, evaluate the IgA reactivity by ELISA and evaluate the IgA reactivity by “immunoblotting”. In addition, this work aimed to verify the neutralizing all titles of the samples. All of them had antibodies reactive with G3P[2] and G9P[8] and showed varied neutralization titles. There was a significant correlation between anti-G9P[8] IgA titers and the neutralizing ones, but the same was not observed for serotype G3P[2]. All samples recognized some viral antigenic fraction in “immunoblotting” test, but it was not possible establish a correlation between high antibodies levels and some specific antigenic fraction. This approach may be important for studies concerning vaccination strategies.

Keywords: Rotavirus. G3P[2]. G9P[8]. SIgA. Breastfeeding. Neutralization.

1 INTRODUÇÃO

O rotavírus é um agente causador de gastroenterites que acomete principalmente recém-nascidos e crianças de até 5 anos de idade em todo o mundo. A taxa de mortalidade pelo rotavírus entre 1986 e 2000 foi de aproximadamente 400.000 mortes, sendo também responsável por cerca de 111 milhões de casos de gastroenterites que necessitaram de cuidados em casa, 25 milhões que requereram cuidados médicos e 2 milhões de hospitalizações por ano (PARASHAR et al., 2003). Em estudo mais recente foi mostrado que entre 2000 e 2004 a média do número de mortes aumentou chegando a aproximadamente 611.000 por ano (PARASHAR et al., 2006).

Sartori et al. (2008) fizeram um levantamento nos bancos do Sistema Único de Saúde (SUS) e do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) entre 1999 e 2006. Foi estimado que no Brasil, a gastroenterite infantil causada por rotavírus foi responsável por aproximadamente 3 milhões de episódios de diarreias por ano, ocasionando 850 mortes.

Os países desenvolvidos possuem uma taxa de mortalidade causada por rotavírus menor que nos países em desenvolvimento, mesmo assim estima-se que todas as crianças até os 5 anos de idade já tenham apresentado pelo menos um episódio de diarreia causada por esse vírus (PARASHAR et al., 2003). Esses dados indicam que apenas medidas profiláticas de higiene e saneamento básico não são suficientes para evitar o contágio. Consequentemente foi recomendado o desenvolvimento de vacinas contra os rotavírus que pudessem ser amplamente utilizadas, prevenindo assim a doença grave e fatal (DEZOYSA e FEACHEM, 1985; GLASS, 2006; PARASHAR et al., 2003).

O primeiro relato de diarreia por rotavírus foi descrito e comprovado por Bishop et al. (1973) na Austrália. O nome do vírus foi proposto devido à sua semelhança morfológica com uma roda, que em latim denomina-se “rota”, quando observado em eletromicrografia, conforme mostra a figura 1. Esses pesquisadores analisaram por microscopia eletrônica cortes ultrafinos de biópsia da mucosa duodenal de crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda. No Brasil, o vírus só foi detectado em 1977, na cidade de Belém do

Pará, em crianças com diarreia aguda, onde duas a cada 13 amostras de fezes continham rotavírus (LINHARES et al., 1977).

Figura 1: Eletromicrografia de rotavírus (EBRAHIM, 2008).

A morfologia do rotavírus é icosaédrica sendo que a partícula viral completa mede 70 nm de diâmetro (ESTES e COHEN, 1989). A partícula viral íntegra é formada por três camadas protéica, sendo esta infectante e denominada de “partícula com tripla camada” (“Triple-Shelled”-TS) (Figura 2). A camada protéica mais externa é o capsídeo externo formado pelas proteínas VP4 e VP7 e a mais interna é o capsídeo interno composto pela proteína VP6. A partícula sem a camada externa é composta por duas camadas protéicas denominada de “Double-Shelled”-DS. O terceiro tipo de partícula observada é a camada simples (“Single-Shelled”-SS), também conhecida como “core”, a qual o RNA genômico está associada (ESTES e KAPIKIAN, 2007). As partículas virais encontradas nas fezes possuem apenas a camada mais interna (“Single-Shelled”-SS). As partículas também podem ser encontradas, menos frequentemente, sem o capsídeo, contendo apenas 11 segmentos do RNA dupla-fita envolvidos por uma membrana interna (core). Este RNA codifica proteínas estruturais (VP1 a VP8) e não estruturais (NSP1 a NSP5) (ESTES e COHEN, 1989).

Figura 2: Representação esquemática da estrutura do rotavírus (ANGEL et al., 2007).

O rotavírus apresenta tropismo pela superfície de enterócitos maduros do epitélio colunar na superfície dos vilos do intestino delgado, os quais têm uma função digestiva e absorptiva, porém as partículas virais podem ser detectadas no citoplasma (ESTES, 2001).

A ligação do rotavírus à célula hospedeira é determinada pela proteína VP4, após clivagem pela tripsina pancreática em VP5 e VP8 (LUDERT et al., 1996). A penetração na célula é mediada por VP4 e VP7, através das integrinas $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 4\beta 1$ ou pode acontecer diretamente, através da membrana celular ou por endocitose (CIARLET et al., 2002).

A replicação das partículas virais faz cessar a síntese de DNA, RNA e proteínas das células infectadas e desencadeia um aumento na concentração de cálcio intracelular por intermédio da proteína viral não estrutural NSP4. Ocorre uma degeneração destas células pela liberação das partículas virais por lise, acarretando a destruição e atrofia dos vilos intestinais. O epitélio assim perdido acaba sendo repostado por enterócitos cubóides e imaturos das criptas da mucosa intestinal, podendo, em casos graves, ser observado um epitélio plano no intestino delgado (ESTES, 2001).

A consequência dessa modificação é a diminuição das dissacaridases produzidas por estas células, ocorrendo um acúmulo de dissacarídeos

(maltose, lactose e sacarose) no lúmen intestinal. Como não há uma reabsorção normal, cria-se um meio hipertônico em relação ao líquido extracelular, agravado pela secreção de sódio, cloro e bicarbonato pelas células das criptas então predominantes, o que determina a perda de água no sentido meio extracelular-lúmen, caracterizando uma diarreia osmótica (LEUNG et al, 1988).

A principal via de transmissão do vírus é a fecal-oral, no entanto, considerando-se que a taxa de infecção é extremamente alta mundialmente, a despeito dos padrões de higiene principalmente em países desenvolvidos, tem-se especulado que a transmissão pode ocorrer por via respiratória. A ocorrência de sintomas respiratórios em alguns indivíduos acometidos pela virose e a detecção do antígeno viral na secreção traqueal de crianças reforçam essa hipótese (SANTOS, 2002).

A dose infectante para uma criança pode ser menos de 10 partículas virais e a excreção máxima delas ocorrem entre o 3º e 4º dia da doença, sendo possível encontrar mais de 10^9 partículas por grama de fezes. As infecções por rotavírus podem ocorrer de forma subclínica ou assintomática. A doença é caracterizada por febre e vômitos seguidos de diarreia aquosa e intensa. O período de incubação gira em torno de 1 a 2 dias. Os sintomas da infecção geralmente duram de 3 a 8 dias, o que pode acarretar desidratação e morte (RÁCZ et al., 2005). Um efeito colateral grave é a ocorrência de intussuscepção intestinal, uma condição na qual uma porção do intestino invagina em outra porção produzindo obstrução intestinal (NAKAGOMI, 2000).

A infecção nosocomial por rotavírus é descrita frequentemente em crianças menores de 5 anos, principalmente em creches, pré-escolas e enfermarias, sendo que de 20 a 40% são assintomáticas contribuindo para a propagação do vírus e reduzindo a eficiência das medidas de prevenção (GLEIZES et al., 2006).

A altíssima concentração das partículas virais nas fezes excretadas na fase aguda direcionou a padronização de metodologias rápidas para o diagnóstico laboratorial baseadas na identificação direta de partículas ou antígenos virais nas fezes. Várias metodologias podem ser empregadas como a microscopia eletrônica direta (ME) (BISHOP et al., 1973) e imunomicroscopia eletrônica (PEREIRA et al., 1983). Ambas são bem específicas para detecção

do antígeno, sendo que a ME pode resolver a discrepância de resultados obtidos por outras técnicas. Essas técnicas são inviáveis para diagnóstico de rotina, pois demanda tempo, alto custo de material e pessoal especializado para a leitura dos resultados.

Os métodos mais utilizados em casos de surtos coletando amostras de fezes são: o kit de ensaio imunoenzimático (EIARA) para o diagnóstico de rotavírus do grupo A e adenovírus (PEREIRA et al., 1985) e o teste de aglutinação passiva de látex utilizando anticorpos poli e monoclonais que apresentam grande praticidade e especificidade (SANTOS e NOZAWA, 1991).

As propriedades antigênicas do rotavírus - grupo, subgrupo e sorotipo são determinadas pelas proteínas do capsídeo viral. A proteína VP6, a qual circunda o core, situa os determinantes antigênicos grupo-específicos (A-G) e subgrupos I e II (detectados por anticorpos monoclonais dentro do grupo A). Constitui-se na proteína viral mais abundante, representando 51% do vírion, com sua síntese relacionada ao sexto segmento genômico viral (ESTES, 2001). A maioria dos rotavírus humanos pertence ao grupo A.

Os integrantes do grupo A são os rotavírus mais amplamente dispersos, sendo predominantes na natureza e associados à diarreia no homem e em diversas espécies animais. A gastroenterite causada por rotavírus em animais proporciona problemas econômicos na agropecuária, pois atingem porcos, bovinos e eqüinos, além de outros mamíferos como macacos. Os grupos designados de B a G compreendem, em geral, amostras que infectam animais, com a proteína VP6 diferente daquela comum aos rotavírus do grupo A. Tais amostras não são detectadas por técnicas sorológicas convencionais, sendo sua identificação em geral efetuada por imunomicroscopia eletrônica, eletroforese do dsRNA em gel de poliacrilamida e metodologias moleculares (KAPIKIAN et al., 2001).

As proteínas externas do capsídeo, VP7 (glicoproteína ou proteína G) e VP4 (proteína sensível à protease ou proteína P) determinam a especificidade do sorotipo e são as bases da classificação binária dos rotavírus. Ambas as proteínas induzem anticorpos neutralizantes que podem estar envolvidos na imunidade protetora (PARASHAR et al., 1998).

Dezenove tipos de proteína G e vinte e sete tipos de proteína P já foram identificados em infecções humanas e animais. A incidência e distribuição de P

e G variam dependendo das áreas geográficas e estações do ano (MATTHIJNSSENS et al., 2008).

Nos países de clima temperado os picos endêmicos ocorrem durante os meses frios do ano, já nos países de clima tropical a ocorrência dessa gastroenterite é observada durante todo o ano (KAPIKIAN et al., 2001).

As técnicas de biologia molecular permitiram a ampliação dos estudos dos sorotipos encontrados na população, determinando os genótipos G e P. Ensaio molecular em reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizam iniciadores específicos para cada genótipo, permitindo um levantamento epidemiológico (GOUVÊA et al., 1990).

Estudos epidemiológicos em torno do mundo demonstraram que as combinações G1P[8], G3P[8], G4P[8], G2P[4], G9P[8], e G9P[6] são responsáveis pela maioria das infecções por rotavírus. Entretanto, outros tipos de proteínas G e P como G5, G6, G8, G10, G12, P [9], P [11], e P [14] também aparecem com certa frequência em diferentes regiões (KOSHIMURA et al., 2000; SANTOS e HOSHINO, 2005).

Há uma grande diversidade de cepas de rotavírus circulantes no Brasil, mas relatos completos sobre elas ainda são escassos. A análise dos resultados epidemiológicos em porcentagem é determinada pela quantidade de rotavírus nas amostras fecais de pacientes já diagnosticados como positivos para gastroenterite por rotavírus.

Apesar de ter diminuído o número de amostras de fezes coletadas no Brasil entre 2006 a 2008, houve um aumento da positividade para o rotavírus, como mostra a figura 3.

Figura 3: Amostras coletadas e percentual de positividade 2006-2008 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Os genótipos de rotavírus identificados nos estados do Brasil no período de 2006 - 2007 estão representados na tabela 1.

Tabela 1: Genótipos de Rotavírus encontrados por Estado do Brasil (MS, 2008).

UF	Genótipos		Nº Amostras de Rotavírus*
	2006	2007	
AM	-	G2P4/G1P8	230
SP	G1P[4], G1P[8], G9P[8], G9P[6]	G2P[4], G1P[8], G9P[8], G3PnT	227
RJ	-	G2P4	89
RS	-	G9P8/G2P4	71
BA	G2 [P4]G9	G9P8/G2P4P6	70
MG	-	G2P4	55
ES	G2P[4]G1,G9P[8]	G2P4	52
SC	G2P[4], G9PnT, G3PnT	-	51
TO	G2 P[4]	-	37
PA	-	G2P4/G1P8	21
PR	G1P[8],G9P[8],G2P[4]	G9P8	19
MS	G2P[4]	G2P4	16
SE	-	G2P4	15
MA	-	G2P4/G2P6	14
GO	G2P[4]	-	10
AL	-	G2P4	9
PE	-	G2P4/G1P8	5
MT	-	G1P4/G2P4	2
Brasil			1201

*Nem todas foram genotipadas

O sorotipo G3 já foi bastante relatado no Brasil, mas em menor porcentagem, como mostram vários trabalhos epidemiológicos (CARMONA et al., 2006, ROSA E SILVA et al., 2002, SANTOS et al., 2005). Porém, ele não tem sido encontrado com frequência mais recentemente (Tabela 1).

Carmona, et al. (2006) avaliaram 3.101 amostras de fezes coletadas de pessoas infectadas no estado de São Paulo durante 8 anos (1996 a 2003) e relataram a presença do sorotipo G1 em 68,2% das amostras, G9 em 17,2%, G4 em 6,3%, G2 em 1,2% e G3 em 0,7%, sendo que G9 só foi encontrado a partir de 2000. Avaliou-se também que todas essas gastroenterites ocorreram principalmente durante o inverno e estações secas. Essa sazonalidade foi observada em um estudo feito no Hospital Albert Einstein onde a frequência da doença ocorreu de maio a agosto em crianças cuja idade variava entre 6 meses e 5 anos (CARRARO et al., 2008).

O sorotipo G9 é um vírus emergente, foi detectado pela primeira vez na Filadélfia entre 1982-1984, em 9,2% das crianças com diarreia causada por rotavírus (CLARK et al., 1987) e depois só foi encontrado novamente em 1990, aproximadamente uma década depois. Mais tarde esse sorotipo foi tido como o 4º mais comum encontrado na população mundial (SANTOS e HOSHINO, 2005).

Estudos epidemiológicos realizados no Brasil são isolados, mas forneceram informações importantes. No Rio de Janeiro, no período entre 2000 e 2004 foi relatada a incidência de 49,6% de G1, 30,2% de G9 e 17,8% de G4 (VOLOTÃO et al., 2006). No período entre 1998 e 1999, em Juiz de Fora (MG) o sorotipo G3 foi encontrado em 60% dos casos de gastroenterite por rotavírus, G1 em 27%, G4 em 5%, G8 em 20% e G9 em 8%, evidenciando uma alta incidência de G3 (ROSA E SILVA et al., 2002).

Em um trabalho avaliando crianças hospitalizadas com diarreia grave em Salvador, Santos et al. (2005) apontaram o sorotipo G9 (78,8%) como predominante e muitas vezes encontrado associado com P[8]. Outros sorotipos também foram detectados como G1 (12%) e G4(1,4%).

Um estudo feito em Recife entre os anos de 2004 e 2005, coletando 290 amostras de fezes em crianças de 0 a 5 anos, também demonstrou que G9 tem sido frequentemente encontrado, sendo detectado em 30% das amostras. Outro sorotipo emergente detectado foi G8 (2%) (MONTENEGRO et al., 2007).

Na cidade de São Paulo entre 1994 e 1995 foram coletadas amostras de fezes de crianças com ou sem diarreia. Foram detectados 55,5% de G1, 5,5% de G2 e G3 e 16,7% de G5, freqüentemente associados com P[8] (CARMONA et al., 2004). Já em amostras coletadas de 1996 a 2003 não foi detectado G5, caracterizando-se como um vírus endêmico (CARMONA et al., 2006).

O sorotipo G6 é raramente relatado e encontrado em humanos. Em Campinas, São Paulo, foi identificado em 3 amostras de um total de 328 no ano de 2004. Também foram encontrados nessas amostras G3 em 26,1%, G9 em 18,7%, G1 em 17,9% e G5 em 9% associados com P[8], entre 2003 e 2004 (MARTINI et al., 2008).

Os dados epidemiológicos permitem verificar quais sorotipos estão predominantes em um determinado tempo e região. Muitas vezes eles apontam para G1 como o sorotipo predominante, seguido de G2 e G9 (emergente),

entretanto como já relatado, isso não é uma regra, pois G9 também aparece predominantemente e, em alguns casos, G3.

Devido à grande incidência dessa doença muitos grupos se dedicaram ao desenvolvimento de uma vacina. As vacinas vivas atenuadas administradas oralmente foram o foco do desenvolvimento da maioria das estratégias de imunização contra rotavírus por simular a proteção conferida pela infecção natural (OFFIT, 2002).

Em 1998, uma vacina tetravalente rhesus-rotavirus - RRV-TV (Rotashield®, Wyeth-Lederle), foi recomendada para a vacinação rotineira de bebês nos Estados Unidos com a administração de 3 doses com 2, 4, e 6 meses de vida (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1999a). Entretanto, a RRV-TV foi retirada do mercado após 1 ano do início de seu uso por causa de sua associação com casos de intussuscepção (CDC, 1999b).

Atualmente duas gerações de vacina estão sendo distribuídas: Rotarix (GlaxoSmithKline) e RotaTeq (Merck). A Rotarix é uma vacina monovalente, composta de rotavírus humano atenuado G1P[8], sendo administrada a primeira dose em crianças de 6 a 14 semanas e a segunda de 14 a 24 semanas, sendo que o intervalo entre elas deve ser no mínimo de 1 mês. Essa vacina foi testada em alguns países da América Latina como Brasil, Venezuela e México (RUIZ-PALACIOS et al., 2006). A vacina Rotarix foi incluída no Programa Brasileiro de Vacinação em março de 2006, sendo aplicada em crianças com idade entre 2 e 4 meses (SARTORI et al., 2008). Nos Estados Unidos essa vacina foi aprovada no começo de 2008 e não foram relatados casos de intussuscepção. Atualmente 100 países já licenciaram essa vacina (REISINGER et al., 2008, VESIKARI, 2008).

A RotaTeq é uma vacina pentavalente bovina-humana administrada em três doses. Ela é composta por partículas de sorotipo bovino atenuado (WC3) contendo genes de rotavírus humano que codificam as proteínas VP4 (P1) e VP7 (G1, G2, G3 e G4) e com replicação limitada no intestino delgado. Essa vacina foi licenciada nos Estados Unidos em fevereiro de 2006, sem notificação de casos de intussuscepção e atualmente ela está licenciada em 70 países (SARTORI et al., 2008; VESIKARI, 2008).

Um estudo feito em Israel por Chodick et al. (2009) demonstrou que a vacina Rotarix parece ser mais eficiente que a Rotateq, além de ter um custo menor.

Recentemente no Brasil uma vacina pentavalente humana foi licenciada no Instituto Butantan e tem sido desenvolvida para promover a proteção para os 5 sorotipos mais comuns no país (G1, G2, G3, G4 e G9) (REISINGER et al., 2008; VOLOTÃO et al., 2006).

A vacinação é uma importante prática de imunização. Devido à grande variedade de combinações entre G e P, a vacina pode agir selecionando outros sorotipos no ambiente. Como demonstrado por Gurgel et al. (2007), em Sergipe, após a introdução da vacina Rotarix (G1P[8]), o genótipo prevalente foi G2P[4], ou seja a vacinação forneceu proteção eficaz contra os sorotipos não-G2.

Estudos vêm sendo feitos para entender melhor como o sistema imune interage para eliminar o rotavírus. Franco et al. (2006) propuseram um modelo no qual os antígenos de rotavírus estimulariam dois compartimentos da resposta imune, um sistêmico e outro de mucosa.

No sistema de mucosa o rotavírus é captado nas Placas de Peyer onde sensibiliza linfócitos que passam a expressar moléculas de superfície que permitem sua circulação pelo organismo e retorno às mucosas. As células secretoras de anticorpos que retornam à lâmina própria do intestino secretam IgA diméricas, aptas a mediar a expulsão e exclusão do vírus. No compartimento sistêmico os antígenos estimulam as células B de memória que, mediados por receptores, recirculam no sangue, voltam ao baço e secretam IgA e IgG monomérica que são os mais importantes anticorpos presentes no soro. Contudo, a relação entre os anticorpos do soro e da cavidade intestinal ainda não é completamente entendida, já que alguns anticorpos sistêmicos podem potencialmente neutralizar vírus no intestino e a IgA do soro pode se correlacionar com a IgA intestinal (FRANCO et al., 2006).

A presença desses anticorpos anti-rotavírus pode ser detectada por ELISA em amostras de colostro, leite e soro, permitindo uma avaliação do grau de exposição ao rotavírus, observação da presença ou ausência de soroconversão em crianças vacinadas, além de verificar um perfil do sorotipo

mais incidente na população (ASENSI et al., 2006; CARMONA et al., 2006; GONZÁLES et al., 2005).

O aleitamento materno constitui uma das principais armas na prevenção das diarreias causadas por patógenos como a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *Shigella*. No trabalho de Araújo et al. (2005) foram analisadas amostras de colostro e leite de 22 mães, verificando que as concentrações de IgA secretória total apresentaram-se mais elevadas no colostro com declínio acentuado na primeira semana e se mantiveram constantes no decorrer da lactação. Foram também detectados anticorpos anti-EPEC e anti-*Shigella* nessas amostras, determinando assim que as mães tiveram um contato prévio com esses antígenos.

Nos últimos anos tem sido estudado em detalhes os mecanismos de proteção conferidos pelos anticorpos secretores de classe IgA no colostro e leite humanos contra gastroenterites causadas por bactérias diarreioagênicas como *Escherichia coli* enteroinvasiva, EIEC (CARBONARE et al., 1995), *Escherichia coli* enteroagregativa, EAEC (FERNANDES et al., 2001) e *Escherichia coli* produtoras de Toxina Shiga, STEC (PALMEIRA et al., 2001).

O período de lactação é caracterizado por estágios de colostro e leite. O colostro é uma secreção líquida, amarelada, rica em proteínas, com alta concentração de sódio, potássio, cloro e anticorpos, sendo produzido desde o último trimestre da gestação até aproximadamente 72 horas pós-parto. Entre 30 e 40 horas após o parto começa a aumentar a produção láctea até ser considerado leite, sendo assim as concentrações de sódio, cloro e proteínas diminuem à medida que aumentam as concentrações de lipídeos, citrato e lactose (LAMOUNIER et al., 2006).

Tanto o colostro como o leite proporcionam ao recém-nascido importantes fatores de defesa contra agentes infecciosos aos quais eles estão expostos ao nascimento e nos primeiros meses de vida. O leite é importante também do ponto de vista materno, protegendo as glândulas mamárias contra agentes infecciosos e prevenindo proliferação de células neoplásicas (FERREIRA et al., 1998).

O sistema imune de mucosas no recém nascido ainda não se encontra amadurecido. As Placas de Peyer contêm apenas os centros germinativos primários, as células B da submucosa produzem apenas IgM e praticamente

não se encontram células de memória (CARBONARE et al., 2006). Dessas considerações pode-se inferir a importância do leite materno como alimentação preferencialmente exclusiva para o recém nascido (FERREIRA et al, 1998).

A IgA secretória (SIgA) é a imunoglobulina encontrada em maior concentração no leite e colostro humanos, a qual serve como primeira linha de defesa das mucosas. As funções da SIgA na mucosa estão relacionadas com a neutralização intracelular, excreção do vírus e imunidade passiva. A SIgA corresponde a 10% da proteína do leite e previne também a adesão de microorganismo na superfície intestinal (CARBONARE et al., 2006).

Os anticorpos secretores da classe IgA apresentam uma estrutura peculiar, extremamente adaptada para agir nas condições das superfícies mucosas. É uma imunoglobulina polimérica, formada por duas unidades de IgA, interligadas pela cadeia J e pelo componente secretor (produzido pela célula epitelial), que parece proteger as moléculas de anticorpo de serem degradadas por ácidos graxos e enzimas digestivas no estômago e intestino. Os plasmócitos na submucosa sintetizam o dímero de IgA e a cadeia J. Durante a passagem da IgA através das células epiteliais da mucosa, o componente secretor é adicionado e a IgA secretora completa é secretada no lúmen (CARBONARE et al., 2006; NEWMAN, 1995).

Cada tipo de anticorpo que a mãe sintetiza é resultado da ingestão, inalação ou alguma outra forma de contato com o antígeno, sendo assim a SIgA é específica. Como a mãe produz os anticorpos contra antígenos do ambiente em que vive, a criança recebe a proteção contra os patógenos comuns de sua comunidade (NEWMAN, 1995). Além dos anticorpos, o colostro e leite materno possuem outros elementos que promovem a defesa do lactente, como lisozima e lactoferrina (GRASSI et al., 2001).

No caso da infecção por rotavírus, os trabalhos que exploram os mecanismos de proteção conferidos pelos anticorpos secretores da classe IgA são escassos e não há consenso a respeito do efeito protetor do aleitamento materno na infecção por rotavírus.

Existem trabalhos na literatura que demonstram a presença de anticorpos no leite e colostro humanos reativos com rotavírus. Mas o possível papel destes anticorpos ainda não foi totalmente definido (TAKAHASHI et al., 2002; VAN DE PERRE, 2003).

A proteção do colostro e leite materno foi estudada por Grumach et al., 1993, em 66 mães, divididas em 3 grupos (bebês termos com peso inadequado à idade gestacional, bebês pré-termo e de termos com peso adequado à idade gestacional) que cederam colostro (48 horas) e leite (7, 15, 30 e 60 dias). Verificou-se a presença de lisozima e IgA secretória contra rotavírus, *Herpes simplex*, *Varicella zoster* e *Cytomegalovirus*, demonstrando que a amamentação é um importante contribuidor para defesa do sistema de mucosas.

Mastretta, et al. (2002), estudando infecção nosocomial por rotavírus em um grupo de 220 crianças hospitalizadas, observaram que a taxa de aquisição da infecção entre as crianças amamentadas foi de 10,6% contra 32,4% no grupo de crianças não amamentadas. Além disso, a amamentação foi associada à redução da incidência dos sintomas da diarreia. Asensi et al. (2006) mostraram a capacidade de amostras de colostro, leite e soro em neutralizar a infectividade de cepas de rotavírus SA-11, Wa e VA70, mas não conseguiram obter uma correlação entre o efeito inibitório e concentração de IgA.

A atividade neutralizante dos anticorpos presentes no soro também foi avaliada por Johansen e Svensson (1997) que demonstraram que IgA sérica possuía capacidade de neutralização do rotavírus e que reconhecia epitopos tanto de VP4 quanto de VP7.

A eficácia dos anticorpos da classe IgA na proteção contra o rotavírus já foi demonstrada em outras espécies. Bezerros neonatos foram inoculados oralmente com rotavírus e após 36 horas foi administrado também oralmente o colostro imune proveniente de vacas imunizadas com rotavírus bovino atenuado. Os resultados demonstraram que os anticorpos presentes no colostro proporcionam proteção passiva contra o rotavírus, já que os bezerros alimentados com colostro não imune desenvolveram a doença (PARREÑO et al., 2004). Esses resultados são consistentes com os previamente encontrados em porcos gnotóbicos (PARREÑO et al., 1999).

Outro aspecto que também tem sido estudado é a possível neutralização do vírus vacinal pelo aleitamento materno dado após vacinação. Pichichero, et al. (1990) e Rimer, et al. (1992) demonstraram que quando a vacina oral Rhesus Rotavírus foi administrada junto com a amamentação houve uma

diminuição da soroconversão, ou seja, a amamentação inibiu sua eficácia. Essa relação também foi encontrada por Glass, et al. (1991) que observaram uma taxa de soroconversão de 45% e 56% em bebês amamentados e alimentados com leite industrializado, respectivamente.

Como as proteínas VP4 e VP7 elicitam anticorpos neutralizantes, seria relevante a pesquisa de anticorpos contra estes antígenos no leite e colostro para se avaliar o possível papel protetor destes anticorpos bem como uma possível interferência deles na soroconversão pós-vacinal. Não se conhece a capacidade da IgA presente no colostro humano em neutralizar o rotavírus nem seu perfil de reconhecimento dos antígenos VP4 e VP7.

6 CONCLUSÕES

- As amostras de colostro e leite possuem variados níveis de anticorpos SIgA anti-rotavírus sorotipos G3P[2] e G9P[8].
- As amostras de colostro e leite apresentaram capacidade neutralizante dos sorotipos G3P[2] e G9P[8] em variados graus.
- Outros fatores presentes no colostro e no leite, além dos anticorpos, podem ser responsáveis pela neutralização viral observada.

REFERÊNCIAS

AMARAL, J. A.; TINO DE FRANCO, M.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S.; CARBONARE, S. B. Anti-enteropathogenic Escherichia coli immunoglobulin Y isolated from eggs laid by immunized Leghorn chickens. **Res. Vet. Sci.**, v.72, p. 229-234, 2002.

ANGEL, J.; FRANCO, M. A.; GREENBERG, H. B. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, n. 7, p. 529-539, 2007.

ARAÚJO, E. D.; CARBONARE, S. B.; DE ARAÚJO, M. C.; PALMEIRA, P.; AMARAL, J. A.; SALES, V. S. Total and specific IgA in colostrum and milk of mothers of Natal-Rio Grande do Norte, Brasil. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. Suppl. 1, p. 178-184, 2005.

ASENSI, M. T.; MARTINEZ-COSTA, C.; BUESA, J. Anti-rotavirus Antibodies in Human Milk: Quantification and Neutralizing Activity. **J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.**, v. 42, n. 5, p. 560-567, 2006.

BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, I. H.; RUCK, B. J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **Lancet**, v. 2, n. 7841, p. 1281-1283, 1973.

CARBONARE, S. B.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Composição do leite materno: Aspectos imunológicos. In: Rego, J.D. **Aleitamento Materno**, 2. ed. São Paulo: Atheneu, p. 103-120, 2006.

CARBONARE, S. B.; SILVA, M. L.; PALMEIRA, P.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. Human colostrum IgA antibodies reacting to enteropathogenic Escherichia coli antigens and their persistence in the faeces of a breastfed infant. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, v. 15, n. 2, p. 53-58, 1997.

CARBONARE, S. B.; SILVA, M. L. M.; TRABULSI, L. R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Inhibition of by enteroinvasive Escherichia coli by human colostrum: detection of specific IgA related to invasion plasmid antigens. **Int. Arch. Allergy Immuno.**, v. 108, p. 113-118, 1995.

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, n. 6, p. 963-968, 2006.

CARMONA, R. C.; TIMENETSKY M. DO C.; DA SILVA, F. F.; GRANATO, C. F. Characterization of rotavirus strains from hospitalized and outpatient children with acute diarrhoea in São Paulo, Brazil. **J. Med. Virol.**, v. 74, p. 166-172, 2004.

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. **J. Infect. Dis.**, v. 12, n. 1, p. 44-46, 2008.

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

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Rotavirus vaccine for the prevention of rotavirus gastroenteritis among children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **Recomm. Rep.**, v. 48, n. RR-2, p. 1-20, 1999b.

CIARLET, M.; CRAWFORD, S. E.; CHENG, E.; BLUTT, S. E.; RICE, D. A.; BERGELSON, J. M.; ESTES, M. K. VLA-2 (alpha2beta1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment. **J. Virol.**, v. 76, n. 3, p. 1109-1123, 2002.

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. 1757-1762, 1987.

CHODICK, G.; WAISBOURD-ZINMAN, O.; SHALEV, V.; KOKIA, E.; RABINOVICH, M.; ASHKENAZI, S. Potential impact and cost-effectiveness analysis of rotavirus vaccination of children in Israel. **Eur. J. Public Health**, v. 19, n. 3, p. 254-259, 2009.

DE ZOYSA, I.; FEACHEM, R. G. Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: rotavirus and cholera immunization. **Bull World Health Organ.**, v. 63, n. 3, p. 569-583, 1985.

- EBRAHIM, G. J. Rotaviruses and rotavirus vaccines. **J. Trop. Pediatr.**, v. 54, n. 2, p. 79-82, 2008.
- ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotavirus. In: **Fields Virology**, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 1917-1974, 2007.
- ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: **Fields Virology**, Philadelphia: Williams & Wilkins, p. 1747-1785, 2001.
- ESTES, M. K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 53, n. 4, p. 410-449, 1989.
- ESTES, M. K.; GRAHAM, D.Y.; GERBA, C.P.; SMITH, E.M. Simian rotavirus SA11 replication in cell cultures. **J. Virol.**, v. 31, n. 3, p. 810-815, 1979.
- FERNANDES, R. M.; CARBONARE, S. B.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S.; TRABULSI, L. R. Inhibition of enteroaggregative Escherichia coli adhesion to HEp-2 cells by secretory IgA from human colostrum. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 20, p. 272-8, 2001.
- FERREIRA, T. R. B.; RIPAMONTE, C.; STELLA, L. C.; ALBADALEJO, R. G. Breastfeeding Immunology. **Ver. Perspectivas Médicas**, v. 9, p. 22-28, 1998.
- FRANCO, M. A.; ANGEL, J.; GREENBERG, H. B. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 2718-2731, 2006.
- GLASS, R. I.; PARASHAR, U. D. The Promise of New Rotavirus Vaccines. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, n. 1, p. 23-33, 2006.
- GLASS, R. I.; ING, D. J.; STOLL, B. J.; ING, R. T. Immune response to rotavirus vaccines among breast-fed and non breast fed children. In: MESTECKY, J.; BLAIR, C.; OGRA, P.L. **In Immunology of Milk and the Neonate**, New York: Plenum Press, p. 249-254, 1991.
- GLEIZES, O.; DESSELBERGER, U.; TATOCHENKO, V.; RODRIGO, C.; SALMAN, N.; MESNER, Z.; GIAQUINTO, C.; GRIMPEL, E. Nosocomial rotavirus infection in European countries: a review of the epidemiology, severity and economic burden of hospital-acquired rotavirus disease. **Pediatr. Infect. Dis.**, p. S12-S21, 2006, Supl. 1.

GONZÁLEZ, R.; FRANCO, M.; SARMIENTO, L.; ROMERO, M.; SCHAEEL, I. P. Serum IgA levels induced by rotavirus natural infection, but not following immunization with the RRV-TV vaccine (Rotashield), correlate with protection. **J. Med. Virol.**, v. 76, n. 4, p. 608-612, 2005.

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

GRASSI, M. S.; COSTA, M. T. Z.; VAZ, F. A. C. Immunologic factors of human milk. **Pediatrics**, v. 23, n. 3, p. 258-263, 2001.

GRUMACH, A. S.; CARMONA, R. C.; LAZAROTTI, D.; RIBEIRO, M. A.; ROZENTRAUB, R. B.; RACZ, M. L.; WEINBERG, A.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Immunological factors in milk from Brazilian mothers delivering small-for-date-term neonates. **Acta Paediatr.**, v. 82, p. 284-290, 1993.

GURGEL, R. Q.; CUEVAS, L. E.; VIEIRA, S. C.; BARROS, V. C.; 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, n. 10, p. 1571-1573, 2007.

HELDT, C. L.; HERNANDEZ, R.; MUDIGANTI, U.; GURGEL, P. V.; BROWN, D. T.; CARBONELL, R. G. A colorimetric assay for viral agents that produce cytopathic effects. **J. Virol. Methods**, v. 135, n. 1, p. 56-65, 2006.

JOHANSEN, K.; SVENSSON, L. Neutralization of rotavirus and recognition of immunologically important epitopes on VP4 and VP7 by human IgA. **Arch. Virol.**, v. 142, n. 7, p. 1491-1498, 1997.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: Fields, B. N.; KNIPE, D. M.; ROWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; MARTIN, M. A.; LAMB, R. A.; ROIZAMAN, B. **Fields Virology**, Philadelphia: Williams & Wilkins, p. 1747-1785, 2001.

KOSHIMURA, Y.; NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O. The relative frequencies of G serotypes of rotavirus recovered from hospitalized children with diarrhea: A 10-year survey (1987-1996) in Japan with a review of globally collected data. **Microbiol. Immunol.**, v. 44, n. 6, p. 499-510, 2000.

KUTSUZAWA, T.; KONNO, T.; SUZUKI, H.; KAPIKIAN, A. Z.; EBINA, T.; ISHIDA, N. Isolation of human rotavirus subgroups 1 and 2 in cell culture. **J Clin Microbiol.** 1983; 16(4):727-30.

LABARRE, D. D.; LOWY, R. J. Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID₅₀ and plaque assays. **J. Virol. Methods**, v. 96, n. 2, p. 107-126, 2001.

LAMOUNIER, J. A.; VIEIRA, G. O.; GOUVÊA, L. C. Composição do leite materno: Fatores nutricionais. In: REGO, J. D. **Aleitamento Materno**, 2. ed. São Paulo: Atheneu, p. 55-71, 2006.

LEUNG, A. K.; PA, I. C. H. Rotavirus gastroenteritis. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, v. 6, n. 3-4, p. 188-207, 1988.

LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; SCHMETZ, C.; MÜLLER, G.; PETERS, D. Duovirus (Rotavirus) in Belém, State of Para, Brazil (preliminary report). **Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 19, n. 4, p. 278-279, 1977.

LUDERT, J. E.; KRISHNANEY, A. A.; BURNS, J. W.; VO, P. T.; GREENBERG, H. B. Cleavage of rotavirus VP4 in vivo. **J. Gen. Virol.**, v. 77, p. 391-395, 1996.

MARTINI, I. J.; GENNARI, G. M.; MARTINS, S. S.; GOUVEA, 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, n. 2, p. 244-246, 2008.

MASTRETTA, E.; LONGO, P.; LACCISAGLIA, A.; BALBO, L.; RUSSO, R.; MAZZACCARA, A.; GIANINO, P. Effect of *Lactobacillus* GG and breast-feeding in the prevention of rotavirus nosocomial infection. **J. Pediatric**, v. 35, n. 4, p. 527-531, 2002.

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, n. 7, p. 3204-3219, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância epidemiológica ampliada das doenças diarréicas agudas causadas por rotavírus. Disponível em: <<http://portalsaude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rotavirus.pdf>>. Acesso em: 04 mar. 2009.

MONTENEGRO, F. M.; CORREIA, J. B.; RODRIGUES FALBO, A.; DOVE, W.; NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O.; CUEVAS, L. E.; CUNLIFFE, N. A.; HART, C. A. **J. Med. Virol.**, v. 79, n. 3, p. 335-340, 2007.

NAKAGOMI, T. Rotavirus infection and intussusceptions: a view from retrospect. **Microbiol. Immunol.**, v. 44, p. 619-628, 2000.

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.; PICKERING, L. K. Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. **Lancet.**, v. 351, n. 9110, p. 1160-1164, 1998.
Newman, J. How breast milk protects newborns. **Scientific American**, v. 4, p. 76-79, 1995.

OFFIT, P. A. The future of rotavirus vaccines. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 13, n. 2, p. 190-195, 2002.

PALMEIRA, P. **Efeito do colostro humano sobre a adesão e a citotoxicidade de Escherichia coli produtoras de toxina Shiga (STEC)**. 117 f. Tese (Doutorado em imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

PARASHAR, U. D.; GIBSON, C. J.; BRESSE, J. S.; GLASS, R. I. Rotavirus and severe childhood diarrhea. **Emerg. Infect. Dis.**, v.12, n. 2, p. 304-306, 2006.
Parashar, U.D.; Hummelman, E.G.; Bresee, J.S.; Miller, M.A.; Glass, R.I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, n. 5, p. 565-572, 2003.

PARASHAR, U. D.; BRESEE, J. S.; GENTSCH, J. R.; GLASS, R. I. Rotavirus. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, n. 4, p. 561-570, 1998.

PARRA, G. I. Seasonal shifts of group A rotavirus strains as a possible mechanism of persistence in the human population. **J. Med. Virol.**, v. 81, n. 3, p. 568-571, 2009.

PARREÑO, V.; HODGINS, D. C.; DE ARRIBA, L.; KANG, S. Y.; YUAN, L.; WARD, L. A.; TO, T. L.; SAIF, L. J. Serum and intestinal isotype antibody responses to Wa human rotavirus in gnotobiotic pigs are modulated by maternal antibodies. **J. Gen. Virol.**, v. 8, n. 6, p. 1417-1428, 1999.

PARREÑO, V.; BEJAR, C.; VAGNOZZI, A.; BARRANDEGUY, M.; COSTANTINI, V.; CRAIG, M. I.; YUAN, L.; HODGINS, D.; SAIF, L. J.; FERNANDEZ, F. Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 100, n. 1-2, p. 7-24, 2004.

PAYMENT, P.; TRUDEL, M. Concentration des virus. In: Payment & Trudel. **Manuel de Techniques Virologiques**, Québec: Presses de l'Université du Québec., p. 35-44, 1989.

PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J. P.; ANDRADE, Z. P.; DE CASTRO, L.; PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J. P.; BARTH, O. M.; SUTMOLLER, F.; FARIAS, V.; et al. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). **J. Virol. Methods**, v. 10, n. 1, p. 21-28, 1985.

PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J. P.; BARTH, O. M.; SUTMOLLER, F.; DE FARIAS, V.; VIDAL, M. N. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 78, n. 4, p. 483-490, 1983.

PICHICHERO, M. E. Effect of breast-feeding on oral Rhesus Rotavirus vaccine soroconversion: A metaanalysis. **J. Infect. Dis.**, v. 162, n. 3, p. 753-755, 1990.

RÁCZ, M. L.; MUNFORD, V.; CASTILHO, J. G.; RESQUE, H. R. GASTROENTERITES VIRAIS. IN: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, v. 4, p. 591-597, 2005.

REIMERINK, J. H.; BOSHUIZEN, J. A.; EINERHAND, A. W.; DUIZER, E.; VAN AMERONGEN, G.; SCHMIDT, N.; KOOPMANS, M. P. Systemic immune response after rotavirus inoculation of neonatal mice depends on source and level of purification of the virus: implications for the use of heterologous vaccine candidates. **J. Gen. Virol.**, v. 88, n. 2, p. 604-612, 2007.

REISINGER, K. S.; BLOCK, S. L. Characteristics of an ideal rotavirus vaccine. **Clin. Pediatr. (Phila)**, v. 47, n. 6, p. 555-563, 2008.

RIMER, H. C.; WASSERMAN, S. S.; FLORES, J.; PICHICHERO, M. E.; LOSONSKY, G. A. Rotavirus-specific breast milk antibody in two populations and possible correlates of interference with Rhesus Rotavirus vaccine seroconversion. **J. Infect. Dis.**, v. 165, n. 5, p. 826-830, 1992.

ROSA E SILVA, M. L.; CARVALHO, I. P.; GOUVÊA, 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, p. 2837-2842, 2002.

RUIZ-PALACIOS, G. M.; PÉREZ-SCHAEEL, I.; VELÁZQUEZ, 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.; et al. Human Rotavirus Vaccine Study Group. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, n. 2, p. 11-22, 2006.

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

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

SANTOS, N.; VOLOTÃO, E. M.; SOARES, C. C.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I.; HOSHINO, Y. Predominance of rotavírus genotype G9 during the 1999, 200, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 8, p. 4064-4069, 2005.

SANTOS, N. S. O. Viroses entéricas. In: Santos, N.S.O.; Romanos, M. T. V.; Wigg, M. D. **Introdução a virologia humana**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 59-74, 2002.

SANTOS, N.; NOZAWA, C. M. Comparação dos testes de aglutinação do látex, microscopia eletrônica e eletroforese em gel de poliacrilamida do RNA viral na detecção de rotavírus em fezes diarréicas de crianças. **Ver. Brasileira de Patologia Clínica**, v. 25, n. 4, p. 117-120, 1991.

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

TAKAHASHI, T.; YOSHIDA, Y.; HATANO, S.; SUGITA-KONISHI, Y.; IGIMI, S.; YAJIMA, M.; KOJIMA, T.; KANNO, T.; YONEKUBO, A.; YAJIMA, T. Reactivity of secretory IgA antibodies in breast milk from 107 Japanese mothers to 20 environmental antigens. **Biol. Neonate**, v. 82, n. 4, p. 238-242, 2002.

VAN DE PERRE, P. Transfer of antibody via mother's milk. **Vaccine**, v. 21, n. 24, p. 3374-3376, 2003.

VESIKARI, T. Rotavirus vaccines. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 7, p. 1-5, 2008.

VIEIRA, P.D. **Padronização de metodologia para pesquisa de anticorpos da classe IgA anti-rotavírus no leite e colostro humanos**. 62 f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

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, n. 2, p. 263-272, 2006.

YOLKEN, R. H.; PETERSON, J. A.; VONDERFECHT, S. L.; FOUTS, E. T.; MIDTHUN, K.; NEWBURG, D. S. Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. **J. Clin. Invest.**, v. 90, n. 5, p. 1984-1991, 1992.

ZAMAN, S.; CARLSSON, B.; JALIL, F.; JEANSSON, S.; MELLANDER, L.; HANSON, L. A. Specific antibodies to poliovirus type I in breastmilk of unvaccinated mothers before and seven years after start of community-wide vaccination of their infants with live, oral poliovirus vaccine. **Acta Paediatr. Scand.**, v. 80, n. 12, p. 1174-1182, 1991.

ZINGALES, B. Analysis of protein by sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. In: **Genes and antigens of parasites, a laboratory manual**, 2nd ed. Ed. C.M.Morel, Dept. of Biochemistry and molecular Biology, Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, p. 357-63, 1984.

WARD, R. L.; KIRKWOOD, C. D.; SANDER, D. S.; SMITH, V. E.; SHAO, M.; BEAN, J. A.; SACK, D. A.; BERNSTEIN, D. I. Reductions in cross-neutralizing antibody responses in infants after attenuation of the human rotavirus vaccine candidate 89-12. **J. Infect. Dis.**, v. 194, n. 12, p. 1729-1736, 2006.

WYATT, R. G.; JAMES, H. D. JR.; PITTMAN, A. L.; HOSHINO, Y.; GREENBERG, H. B.; KALICA, A. R.; FLORES, J.; KAPIKIAN, A. Z. Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 18, n. 2, p. 310-317, 1983.