

VERONICA APARECIDA AMBROSINI

**INVESTIGAÇÃO DE ROTAVÍRUS A EM CRIANÇAS DE ATÉ CINCO ANOS DE
IDADE NO MUNICÍPIO DE GUARAPUAVA – PR**

GUARAPUAVA

2014

VERONICA APARECIDA AMBROSINI

**INVESTIGAÇÃO DE ROTAVÍRUS A EM CRIANÇAS DE ATÉ CINCO ANOS DE
IDADE NO MUNICÍPIO DE GUARAPUAVA – PR**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, da UNICENTRO em associação ampla com a UEPG.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Carraro

GUARAPUAVA

2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por sua presença sempre me abençoa e capacita para tudo aquilo que Ele me destina.

Ao meu orientador pelo apoio, atenção, paciência e conhecimentos repassados durante o mestrado, meu eterno agradecimento.

Ao meu pai e a minha mãe, Delair e Camila, que sempre estiveram comigo e me apoiaram em tudo que desejei fazer, à vocês não existem palavras para descrever qualquer agradecimento, muito obrigada pela vida, pelo amor e por vocês sempre serem os melhores pais do mundo, amo vocês mais que tudo nesta vida.

Aos meus irmãos Arlete, Fábio, André, Luiz Artur, Priscila e Keli que sempre torceram pela minha felicidade.

Aos meus amados sobrinhos Luiz Paulo, Luiz Otávio, Matheus, Camilly e Nathália que sempre trouxeram alegria na minha vida mesmo nos momentos tristes.

Ao meu noivo, Emerson, que sempre esteve comigo acompanhando muito de perto estes dois anos, sempre me incentivando, me ajudando em todos os momentos, te amo eternamente.

A minha segunda família Eni, Cristiane e Rodinei, obrigada pelos votos de incentivo.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNICENTRO, pela enorme dedicação que todos apresentam pelo programa de mestrado, agradeço os professores Najeh e Rubiana que sempre disponibilizaram o laboratório quando precisei.

Ao professor Paulo Roberto da Costa que emprestou o laboratório no início dos experimentos, e à Bruna Saviatto por sempre ter me ajudado.

Ao professor Celso Granato que gentilmente forneceu os controles positivos de rotavírus A.

Aos pacientes que concordaram em participar deste estudo.

A todos os colegas do mestrado pela amizade e companhia durante estes dois anos.

As minhas amigas que tenho um imenso amor Gabriela, Isabela, Ana e um agradecimento especial a Lualís, que esteve mais próxima de mim durante estes dois anos.

As amigas do laboratório de virologia, Juliana, Daniele e Fernanda, em especial a Leni que me acompanhou diretamente durante a realização deste trabalho.

A CAPES e fundação araucária pela bolsa e auxílio financeiro.

RESUMO

A doença diarreica está entre as principais causas de morbidade e mortalidade infantil, o principal agente etiológico é o rotavírus do grupo A. Estima-se que, ele seja responsável por 453.000 mortes em crianças menores que cinco anos de idade em todo o mundo. Os rotavírus são classificados em grupos, de acordo com a especificidade antigênica da proteína estrutural VP6, na literatura foram descritos grupos de A-G. O grupo A é classificado em genótipos ou sorotipos, de acordo com as características das proteínas estruturais VP4 e VP7. Conforme a variabilidade do gene que codifica a proteína VP4 denomina-se a letra P seguida de um número e para VP7 a letra G seguida de um número. Vinte e três genótipos G e trinta e um P já foram identificados causando infecções em humanos e animais. A infecção causada por rotavírus apresenta taxas de incidência semelhantes nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, assim a OMS considera a vacina essencial para redução da doença. No Brasil, em março de 2006, o Programa Nacional de Imunização incluiu a vacina oral para rotavírus humano, com especificidade antigênica G1P8 no calendário de vacinação. Após o início da vacinação diversos estudos apontaram o benefício na redução do número de infecções, hospitalizações e mortalidade infantil causada por rotavírus. O objetivo deste trabalho foi investigar a infecção causada pelo rotavírus em crianças de até cinco anos de idade, vacinadas e não vacinadas, com gastroenterite no município de Guarapuava-PR. Foram coletadas 160 amostras de fezes de crianças de até cinco anos de idade atendidas no serviço público de saúde de Guarapuava-PR, entre os meses de março de 2011 a fevereiro de 2012. Foram otimizadas reações de multiplex-nested-RT-PCR para amplificação dos genes VP7 e VP4 para determinação dos genótipos mais frequentes na população humana. As crianças apresentaram média de 2,8 e mediana de 3 anos de idade e a taxa média de vacinação foi de 83,8%. Os ensaios de RT-PCR para detecção e genotipagem de rotavírus do grupo A, foram padronizados e apresentaram bom rendimento, porém não foram detectados casos de infecção por rotavírus nas 160 amostras de fezes de crianças com gastroenterites de até cinco anos de idade. O presente resultado sugere uma redução na ocorrência da infecção causada pelo rotavírus em crianças com alta taxa de cobertura vacinal no município de Guarapuava-PR.

Palavras-chave: Diagnóstico, gastroenterite, rotavírus, vacinação, genotipagem.

ABSTRACT

Diarrheal disease is among the leading causes of infant morbidity and mortality, the group A rotavirus is the most important as a cause of gastroenteritis in children. It is estimated that it is responsible for 453,000 deaths in children under five years of age worldwide. Rotavirus are classified into groups according to VP6 antigenic specificity and had been describe the literature groups A-B. VP4 and VP7 viral are too importants for genotypes or serotypes determination according to variability of the gene encoding the VP4 protein is called the letter P followed by a number and VP7 the letter G followed by a number. Twenty-three G and thirty P genotypes have been identified causing infections in humans and animals. The infection caused by rotavirus presents similar incidence rates in developed and developing countries, thus to whe considered the vaccination essential for reduce the. In Brazil, in March 2006, the National Immunization Program included oral human rotavirus vaccine with antigen specificity G1P8. After started the vaccination several studies showed the benefits in reducing the number of infections, hospitalizations and mortality caused by rotavirus. The objective of this study was to investigate the infection caused by rotavirus in children until to five years of old, vaccinated and unvaccinated with gastroenteritis in Guarapuava - PR. On hundred sixty stool samples from children under age five attended in the public health service Guarapuava - PR, were included our study between the months of March 2011 through February 2012. Nested multiplex RT-PCR assays for VP4 and VP7 genes amplification and determination of viral genotypes more frequently identified in humans were optimized. The children include had a mean of 2.8 and a median of 3 years, of old and the average of rotavirus vaccination rate was 83.85%. The RT-PCR assays for detection and genotyping of rotavirus group A, were standardized and showed good yield, but no rotavirus infection cases were detected in 160 stool samples from children with gastroenteritis for up to five years of age. This result suggests a reduction of rotavirus infection caused by rotavirus in children with high vaccination coverage rate in Guarapuava.

Keywords: Diagnosis, diarrhea, genotyping, rotavirus, vaccination.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Partículas de rotavírus humano visualizadas por ME.....	13
Figura 2 - Representação esquemática da partícula de rotavírus.....	15
Figura 3 - Frequência dos sintomas em crianças hospitalizadas com GA por rotavírus.....	23
Figura 4 - Etiologia de GA em países desenvolvidos e em desenvolvimento.....	25
Figura 5 - Países com maior mortalidade em crianças menores de cinco anos de idade.....	26
Figura 6 – Número de casos de doença diarreica no Brasil do ano 2000 a 2006.....	27
Figura 7 - Genótipos mais frequentes no mundo todo e no Brasil.....	28
Figura 8 - Perfil de migração em PAGE para o rotavírus do grupo A e do Grupo B.....	34
Figura 9 - Representação dos alvos da multiplex-nested-RT-PCR (gene VP7).....	41
Figura 10 - Representação dos alvos da Multiplex-Hemi-nested-PCR (gene VP4).....	43
Figura 11 - Distribuição entre gêneros dos pacientes incluídos no estudo.....	45
Figura 12 - Distribuição dos pacientes do estudo por faixa etária.....	46
Figura 13 - Distribuição mensal das amostras incluídas no estudo no período de 13 meses..	46
Figura 14 - Eletroforese da primeira amplificação dos genes VP4 e VP7.....	48
Figura 15 - Produtos da segunda amplificação dos genes VP4 e VP7.....	48
Figura 16 - Eletroforese da amplificação do gene VP7 em diluições do controle viral.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes utilizados na reação de RT.....	38
Tabela 2 - Primers utilizados na primeira e na segunda amplificação do gene VP7.....	39
Tabela 3 - Reagentes utilizados na primeira amplificação do gene VP7.....	40
Tabela 4 - Reagentes utilizados para segunda amplificação do gene VP7.....	40
Tabela 5 - Primers utilizados para primeira e a segunda amplificação do gene VP4.....	41
Tabela 6 - Reagentes utilizados na primeira amplificação do gene VP4.....	42
Tabela 7 - Reagentes utilizados na genotipagem do gene VP4.....	43
Tabela 8 - Temperaturas e tempos de anelamento do primers testados nas reações de amplificações dos genes VP4 e VP7.....	47
Tabela 9 - Crianças vacinadas e não vacinadas, de acordo coma faixa etária do paciente e ano da coleta da amostra no período estudado.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA	Ácido Dexorribonucléico Complementar
dATP	Desoxinucleotídeo de Adenina Trifosfato
dCTP	Desoxinucleotídeo de Citosina trifosfato
dGTP	Desoxinucleotídeo de Guanina Trifosfato
DLP	Double-Layered Particles
DNA	Ácido Dexorribonucléico
dNTPs	Desoxinucleotídeos Trifosfato
dTTP	Desoxinucleotídeo de Timina Trifosfato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	ácido etilenoglicol tetra-acético
EIE	Ensaio Imunoenzimático
eIF4G	Fator de Iniciação Eucariótica 4G
EUA	Estados Unidos da América
GA	Gastroenterite Aguda
GTP	Guanisina Trifosfato
HCl	Ácido Clorídrico
IFN	Interferon
KCl	Cloreto de Potássio
kDa	Kilodalton
MDDA	Monitorização Doença Diarreica Aguda
ME	Microscopia Eletrônica
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
NSP	Non Structural Protein
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PNI	Programa Nacional de Imunização
pb	Pares de Base
PFU	Unidade Formadora de Placa
RNA	Ácido Ribonucleico

RNA _m	Ácido Ribonucleico Mensageiro
RPM	Rotação Por Minuto
RT-PCR	Transcrição Reversa-Reação da Cadeia da Polimerase
TRIS	Trisaminometano
VORH	Vacina Oral Rotavírus Humano
VP	Viral Protein

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1.1 DOENÇAS DIARREICAS.....	11
1.2 HISTÓRICO DO ROTAVÍRUS.....	12
1.3 MORFOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO.....	14
1.4 PROTEÍNAS E SUAS FUNÇÕES.....	17
1.4.1 Proteínas estruturais.....	17
1.4.1.1 VP1.....	17
1.4.1.2 VP2.....	17
1.4.1.3 VP3.....	17
1.4.1.4 VP4.....	18
1.4.1.5 VP6.....	18
1.4.1.6 VP7.....	19
1.4.2 Proteínas não estruturais.....	19
1.4.2.1 NSP1.....	19
1.4.2.2 NSP2.....	19
1.4.2.3 NSP3.....	20
1.4.2.4 NSP4.....	20
1.4.2.5 NSP5.....	20
1.4.2.6 NSP6.....	21
1.5 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ROTAVÍRUS.....	21
1.6 TRANSMISSÃO E PATOGÊNESE.....	21
1.7 EPIDEMIOLOGIA DO ROTAVÍRUS.....	24
1.8 VACINAÇÃO.....	29
1.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	31
2. OBJETIVOS.....	36
2.1 OBJETIVO GERAL.....	36
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3 METODOLOGIA.....	37
3.1 POPULAÇÃO.....	37
3.2 AMOSTRAS.....	37
3.3 EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS.....	38

3.4 TRANSCRIÇÃO REVERSA–RT.....	38
3.5 AMPLIFICAÇÃO DO GENE VP7.....	39
3.6 AMPLIFICAÇÃO GENE VP4.....	41
3.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	43
4 RESULTADOS.....	45
4.1 AMOSTRAS.....	45
4.2 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR).....	47
4.3 COBERTURA VACINAL.....	50
4.4 DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS NAS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	50
5 DISCUSSÃO.....	52
6 CONCLUSÃO.....	56
7 REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO.....	73

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 DOENÇAS DIARREICAS

As doenças diarreicas têm sido reconhecidas em seres humanos desde a antiguidade, apesar do sucesso global na redução da mortalidade infantil causada por diarreia nos últimos trinta anos, esta ainda continua sendo a segunda principal causa de morte em crianças menores de cinco anos de idade. Estima-se que a diarreia seja a responsável por três milhões de mortes entre crianças menores de cinco anos por ano no mundo todo (WALKER et al., 2012; LIU et al., 2012). Crianças abaixo de três anos de idade, nos países em desenvolvimento, experimentam em média três episódios de diarreia a cada ano (WHO, 2008; BLACK et al., 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define diarreia como a passagem das fezes amolecidas ou líquidas, em três ou mais vezes, no período de 24 horas. O grau de desidratação é classificado de acordo com os sinais e sintomas que refletem a quantidade de líquido perdido. Nos estágios iniciais de desidratação, não há sinais ou sintomas. Quando os líquidos e eletrólitos não são repostos de forma eficaz, os sinais e sintomas começam a aparecer como a palidez, fraqueza e irritabilidade. Na desidratação grave, estes efeitos tornam-se mais pronunciados e o paciente pode desenvolver choque hipovolêmico. Há também diminuição da pressão arterial, com cianose periférica, que podem levar o paciente ao óbito (WILHELMI, ROMAN, SÁNCHEZ-FAUQUIER, 2003; WHO, 2008).

A diarreia pode ser dividida em três categorias: diarreia aguda, diarreia hemorrágica e diarreia crônica. A diarreia aguda tem duração de horas a alguns dias, normalmente é autolimitada, porém em alguns casos pode ser grave e pode levar a uma profunda desidratação. Na diarreia crônica os episódios duram mais que quatorze dias e na maioria das vezes ocorre a desidratação. Na diarreia hemorrágica, ou disenteria, há presença de sangue e/ou muco nas fezes, sendo uma diarreia mais agressiva que pode causar danos na mucosa intestinal, septicemia e desnutrição (GUERRANT et al., 2001; WHO, 2008; MOORE, 2011).

Gastroenterite aguda (GA), muitas vezes usada como sinônimo de diarreia, é uma síndrome caracterizada por diarreia aguda, geralmente acompanhada de náuseas, vômitos, febre e dor abdominal (COLLETTI et al., 2010). A etiologia da GA é infecciosa e a prevalência dos diferentes agentes etiológicos varia de acordo com localização geográfica,

idade da população, fatores econômicos e estações do ano (GOMES et al., 1991). A etiologia bacteriana é mais comum no verão. Já que as temperaturas mais elevadas favorecem a transmissão de bactérias enteropatogênicas. As bactérias de maior importância são *Escherichia coli*, *Shigella sp.* e *Salmonella sp.* (ALMEIDA et al., 1998).

Os vírus também são reconhecidos como importantes causadores de GA, principalmente em crianças. As GAs de etiologia viral resultam da replicação de vírus que podem causar infecção em outro órgão concomitantemente, como poliovírus e vírus das hepatites A e E, sendo que as infecções entéricas causadas por estes vírus geralmente são subclínicas. As GA também podem ser resultantes da infecção por vírus que possuem replicação restrita ao trato gastrointestinal, geralmente causando sinais e sintomas específicos da gastroenterite (CARTER, 2005).

O rotavírus é a causa mais comum de GA grave em crianças menores de 5 anos de idade. Astrovírus, calicivírus e adenovírus entéricos são também importantes agentes etiológicos virais de GA. Outros vírus, tais como toroviruses, coronavírus, picobirnaviruses e pestivírus, são cada vez mais identificados como agentes causadores de diarreia (WILHELMI; ROMAN, SÁNCHEZ-FAUQUIER, 2003).

Lanata e colaboradores (2013) realizaram uma revisão sistemática sobre estudos publicados relacionados com etiologia de gastroenterite entre os anos 1990 a 2011, descreveram os principais patógenos envolvidos na mortalidade em crianças menores de cinco anos de idade devido à diarreia. Neste estudo foi estimado que o rotavírus seria responsável por 197.000 mortes, *E.coli* enteropatogênica 79.000, calicivírus 71.000 e *E. coli* enterotoxigênica 42.000 mortes em crianças. Ainda no mesmo estudo, os autores sugeriram que estes agentes seriam responsáveis por mais da metade de todas as mortes diarreicas em crianças menores de 5 anos no mundo todo, sendo o rotavírus responsável pelo dobro de mortes do segundo maior patógeno, a *E.coli*.

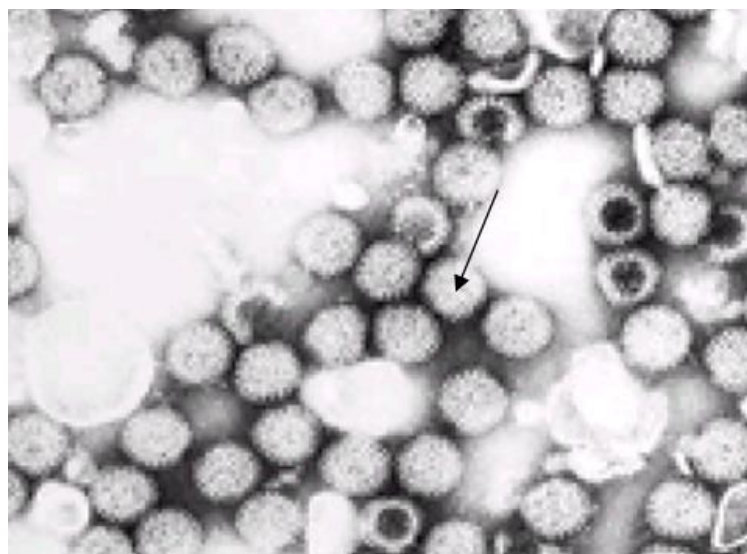
1.2 HISTÓRICO DO ROTAVÍRUS

Nas décadas de 1950 e 1960 surgiu a técnica de cultura de células, que permitiu a descrição de dezenas de vírus, porém até esta época nenhum destes vírus estavam envolvidos com as gastroenterites (YOW et al., 1970; KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001). Em 1972 que Kapikian e colaboradores adaptaram a técnica de imunomicroscopia eletrônica para a descrição de uma partícula de 27nm, em filtrado de fezes de adultos voluntários, e

associaram esta partícula ao surto de gastroenterite não bacteriana na cidade de Norwalk, Ohio, EUA. Estas partículas virais receberam o nome de vírus de Norwalk, um grupo diverso de vírus que hoje é classificado como pertencentes a família de *Caliciviridae* (WANG et al., 1994).

Mais tarde, Bishop e colaboradores (1973) analisaram por microscopia eletrônica (ME) cortes histológicos da mucosa duodenal de nove crianças com gastroenterite e revelaram em seis crianças uma partícula de 70nm, acreditou-se ser uma importante causa de gastroenterite esporádica em crianças em Melbourne, Austrália, e foi chamado de *Orbivirus-like*. No ano seguinte, dois estudos independentes, sendo um realizado por Flewett e colaboradores (1974) no Reino Unido e outro realizado por Bishop e colaboradores (1974) na Austrália, detectaram partículas virais com características semelhantes por ME em amostras fecais de crianças com gastroenterite aguda. Esta partícula de 70nm descrita em casos de GA foi recebendo diferentes denominações, como *Reovirus-like* (KAPIKIAN et al., 1974), *Duovírus* (DAVIDSON et al., 1975) e rotavírus (FLEWETT, BRYDEN, DAVIES, 1974). O nome rotavírus foi oficializado somente em 1979 pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral, sendo esta denominação devido a semelhança da sua morfologia a uma roda (do Latim “rota”) quando observado em ME, conforme a figura 1 (MATTHEWS, 1979).

Figura 1 - Partículas de rotavírus humano visualizadas por ME



Partículas de rotavírus semelhante ao formato de “roda” quando visualizadas por ME. (Adaptada de KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001).

Durante um período relativamente curto, pesquisadores de diversos países detectaram rotavírus nas fezes de pacientes pediátricos com doença diarreica, logo este vírus tornou-se um dos principais agentes etiológicos de GA, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, sempre superando em importância outros agentes etiológicos da doença diarreica (KAPIKIAN et al., 1976).

No Brasil, o rotavírus foi detectado pela primeira vez em 1976 na cidade de Belém, Pará, quando Linhares e colaboradores (1977) visualizaram por ME rotavírus em amostras de fezes de crianças com quadro de diarreia aguda. A partir do achado de Linhares, diversos pesquisadores descreveram a ocorrência do rotavírus como causador de GA e inúmeros estudos epidemiológicos se sucederam no país, integrando um espectro que abrange desde os primeiros achados com ME até a caracterização molecular das estirpes circulantes (BALDACI, et al., 1979; STEWIEN et al., 1991; PEREIRA et al., 1993; MASCARENHAS et al., 1998, ARAÚJO et al., 2001 SANTOS et al., 2003, LUZ et al.; 2005; ANDREASI et al.; 2007).

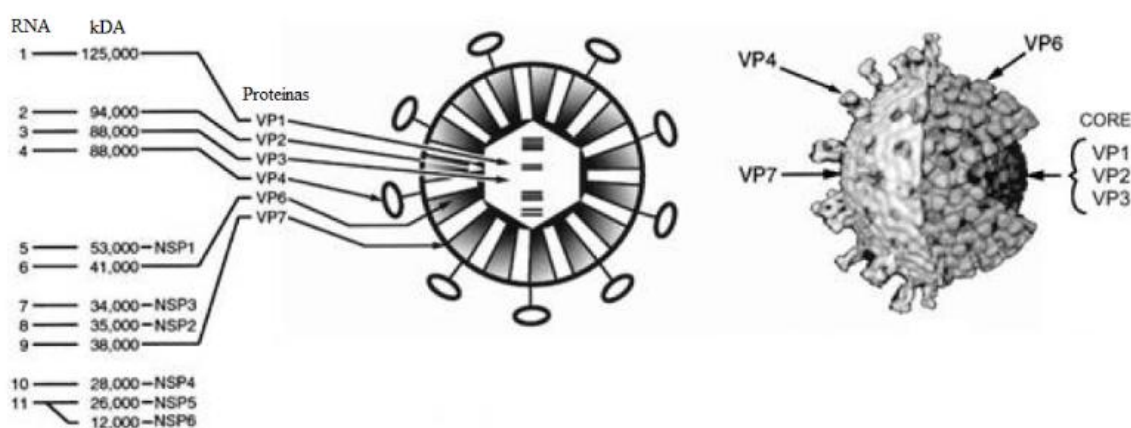
1.3 MORFOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO

O gênero rotavírus pertence a família *Reoviridae*, apresentam uma forma icosaédrica, tamanho de aproximadamente 75nm de diâmetro, e as partículas virais maduras não possuem envelope. A partícula é composta pelo “core” onde estão os 11 segmentos de RNA de dupla fita, uma camada proteica interna, uma camada proteica intermediária, uma camada externa formada por proteínas e glicoproteínas, com 60 espículas distribuídas na superfície. A replicação do vírus ocorre no citoplasma das células infectadas e o cultivo celular *in vitro* é facilitado por meio de tratamento com enzimas proteolíticas, que aumentam a infectividade por clivagem da capsídeo exterior (ESTES, CONHEN, 1989).

O genoma completo do rotavírus possui 18.522pb, os onze segmentos variam de 667pb (segmento 11) a 3302pb (segmento 1). Cada segmento de RNA inicia com uma guanidina na porção 5', seguida de um conjunto de sequências conservadas que corresponde à região 5' não codificante, seguida de uma região codificante de proteína (ORF - Open Reading Frame), finalizada por um código terminador (*stop codon*) e outro conjunto de sequência não codificante formado por duas citosinas na região terminal 3' (KAPIKIAN; HOSHINO, CHANOCK, 2001).

Os onze segmentos codificam um único polipeptídeo, com exceção do segmento 11 que codifica duas proteínas, permitindo que o vírus expresse seis proteínas virais estruturais, designadas com as iniciais VP “Viral Protein”, e cinco proteínas não estruturais, NSP “Non Structural Protein”, conforme esquematizado na figura 2 (ESTES, 2001; GONZALEZ et al., 1998; RAMIG, 2004).

Figura 2 - Representação esquemática da partícula de rotavírus



Da esquerda para a direita: 11 segmentos de RNA; tamanho das proteínas codificadas (kDa); denominação de cada proteína; localização na partícula viral; representação tridimensional, com camadas proteicas externa e intermediária parcialmente removidas para expor a camada interna. (Adaptada de KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001).

A classificação do rotavírus é complexa, considerando as características moleculares ou sorológicas. Historicamente, a proteína VP6 foi a primeira proteína do rotavírus utilizada para a sua classificação. Anticorpos contra esta proteína podem ser facilmente detectados por ensaios imunológicos após uma infecção. De acordo com as propriedades antigênicas desta proteína os rotavírus são divididos em sete grupos sorológicos, de A até G (SVENSSON et al., 1987; ESTES, 2001). Os grupos A, B e C são encontrados em humanos e animais, enquanto que os vírus dos grupos D, E, F e G são encontrados apenas em animais. O grupo A é de maior importância como causador de diarreia em humanos, rotavírus B é menos frequente mas que têm sido associados com diarreias grave, principalmente em adultos na China, (ESTES, COHEN, 1989) e o grupo C já foi detectado no Brasil como causador de GA em adultos (LUCHS et al., 2014).

As proteínas estruturais VP7 e VP4 induzem anticorpos neutralizantes e estão envolvidos na imunidade protetora contra o vírus. São utilizadas para classificar o grupo A

de rotavírus em seus sorotipos ou genótipos, usa-se uma classificação binária destas duas proteínas, sendo que a VP7 é designada pela letra G, por ser uma glicoproteína, e a proteína VP4 é designada pela letra P, esta por ser sensível à protease. Assim, os rotavírus do grupo A recebem uma designação de G e de P, seguidas de um número para sua classificação. Quando a classificação é baseada em ensaios de neutralização com anticorpos monoclonais por exemplo, chama-se sorotipo, e quando a metodologia utilizada depende da análise da composição genética como sequenciamento ou amplificação dos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7 usa-se o termo genótipos (KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001; PARASHAR et al., 1998). Atualmente, vinte três genótipos G e trinta e um genótipos P já foram identificados em rotavírus A (MATTHIJNSSENS et al., 2010).

Em 2008, foi proposto um novo sistema de classificação do rotavírus A, baseado no sequenciamento completo do genoma e não somente de algumas proteínas virais. Este sistema atribui um genótipo específico para cada um dos 11 segmentos, ou seja, todas as proteínas estruturais e não estruturais são consideradas para essa nova classificação: VP7, VP4, VP6, VP1, VP2, VP3, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5/6. A denominação final seria a seguinte: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx. Na qual cada letra representa alguma característica da proteína e a letra x representa um número arábico. Este novo sistema de classificação, tem como objetivo auxiliar a designação de novos genótipos. Desde a sua concepção, o grupo pesquisadores que propuseram esta classificação já registraram 50 novos genótipos para o rotavírus A: VP7 (G20-G26), VP4 (P [28]-P [35]), VP6 (I12-I16), VP1 (R5-R9), VP2 (C6-C9), VP3 (M7-M8), NSP1 (A15-A16), NSP2 (N6-N9), NSP3 (T8-T12), NSP4 (E12-E14) e NSP5 / 6 (H7-H11), identificados em amostras de fezes do homem e de animais (MATTHIJNSSENS et al., 2008).

Outra proposta dessa nova avaliação do genoma completo do rotavírus A é gerar um banco de dados com sequências genômicas completas, associadas aos dados epidemiológicos e clínicos, facilitando a avaliação da eficácia das vacinas e definição de novos genótipos e até mesmo novos grupos de rotavírus. Com números crescentes de sequências completas do genoma de rotavírus tornando-se disponíveis, padronizou-se a seguinte nomenclatura para descrever uma nova cepa de rotavírus: Grupo de rotavírus/origem da espécie/país de identificação/nome comum/ano de identificação/genótipo G e P (MATTHIJNSSENS et al., 2011).

1.4 PROTEÍNAS E SUAS FUNÇÕES

1.4.1 Proteínas estruturais

1.4.1.1. VP1

A proteína estrutural VP1 é codificada pelo segmento 1 do genoma do rotavírus, é a maior proteína viral, com peso molecular de 125.000kDa. VP1 é relativamente hidrofóbica e levemente alcalina. Acredita-se que esta proteína não tenha uma função estrutural muito importante e que sua maior importância está na formação do complexo enzimático em conjunto com a proteína VP3 (ESTES, COHEN, 1989; KAPIKIAN HOSHINO, CHANOCK, 2001). A proteína tem atividade de RNA polimerase dependente de RNA, sintetiza os primeiros transcritos virais e, estes por sua vez, funcionam como RNAm que servem de molde para a síntese das demais proteínas do rotavírus (ESTES, COHEN, 1989; KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001; ZUCKERMAN et al., 2004).

1.4.1.2. VP2

Esta proteína é codificada pelo segmento dois e é a proteína estrutural mais abundante encontrada no “core” viral. Diferente da VP1, esta tem função estrutural bem acentuada, sendo que suas 120 moléculas constituem o envoltório proteico que circunda o genoma viral e, juntamente com a VP6, forma a segunda camada proteica constituindo partículas denominadas *double-layered particles* (DLPs) (ESTES, COHEN, 1989; KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001; ZUCKERMAN et al., 2004). A proteína VP2 é necessária para atividade de replicase da VP1. O grupamento amino terminal da VP2 possui uma atividade de ligação não específica ao RNA viral, sendo que estudos bioquímicos e estruturais sugerem que este grupamento atua como arcabouço para a correta montagem dos componentes do core viral (LAWTON et al., 1997).

1.4.1.3. VP3

A VP3 é codificada pelo segmento três, sendo a menor proteína estrutural, isto faz com que muitas vezes ela migre juntamente com a VP4 em separações eletroforéticas em gel de poliacrilamida (PAGE). É uma proteína básica que contém múltiplas repetições de aminoácidos e está envolvida na replicação do RNA (ESTES, COHEN, 1989). Sua função é menos conhecida, o que é certo é que ela se liga a covalentemente guanosina trifosfato (GTP), indicando ter atividade de guanililtransferase, além de metiltransferase. Ela também

forma um complexo de transcrição em conjunto com a VP1 (KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001).

1.4.1.4. VP4

A VP4 é codificada pelo segmento quatro, compõem o capsídeo externo, em imagens tridimensionais é visualizada como pequenas espículas e tem funções vitais na infecciosidade do vírus e na indução de imunidade (ESTES, COHEN, 1989; KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001).

Após o contato da partícula viral com a célula hospedeira, esta proteína é clivada pela enzima proteolítica tripsina, em VP5 e VP8. Este fenômeno atua na melhoria da infectividade viral, intensificando a penetração do vírus nas células hospedeiras (CLARK et al., 1981; ESTES, CHOEN, 1989). Juntamente com VP7, participa ativamente no processo de adsorção do vírus nas células do hospedeiro, atuando como antígeno indutor de produção de anticorpos neutralizantes por parte do hospedeiro, sendo este fenômeno importante para a aquisição de imunidade em novos episódios de GA causada pelo rotavírus (SVENSSON et al., 1987; ESTES, COHEN, 1989).

1.4.1.5. VP6

A proteína VP6 está localizada na superfície externa das partículas virais, é codificada pelo segmento 6 e exerce papel principal na estrutura viral devido às suas interações com VP4 e VP7 do capsídeo externo e a proteína VP2 do core. É uma proteína trimérica e apresenta epítomos conservados entre diferentes cepas de rotavírus, sendo por isso determinante para a classificação dos grupos de rotavírus (ESTES, COHEN, 1989).

A VP6 desempenha funções biológicas específicas durante a replicação do vírus. Quando a proteína é removida, as partículas virais perdem a atividade de transcrição, indicando sua atividade polimerase. É importante como um componente estrutural das partículas para manter a conformação adequada ou organização do core viral, é altamente imunogênica e antigênica, sendo assim é uma proteína alvo em ensaios de diagnóstico. Também desempenha papel na indução de imunidade protetora (ESTES, COHEN, 1989; KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001).

1.4.1.6. VP7

A VP7 é uma glicoproteína da capsídeo externo, a parte glicídica é formada por moléculas de manose e é a segunda proteína mais abundante da partícula viral. Pode ser codificada pelo segmento sete, oito ou nove dependendo da linhagem celular (Sa11-9; UK bovine-8; rhesus-7). É um trímero que forma polímeros com as proteínas VP4 e NSP4 em células infectadas. Postula-se que íons cálcio são extremamente necessários para sua estabilidade. Desempenha papel importante durante a adsorção do vírus na célula hospedeira. Juntamente com a VP4, são a base para a classificação de sorotipos ou genótipos do rotavírus e são alvos críticos no desenvolvimento de vacinas contra rotavírus, pelo fato de induzirem anticorpos neutralizantes (ESTES, COHEN, 1989; ESTES,1996; KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001; JAYARAM, ESTES, PRASAD, 2004).

1.4.2 Proteínas não estruturais

1.4.2.1. NSP1

NSP1 é a proteína menos conservada do vírus. Possui uma característica comum das proteínas que se ligam a ácidos nucleicos que é uma região rica em cisteína na região aminoterminal, acredita-se que esteja envolvida na replicação de RNA (KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001).

A NSP1 interage com os fatores de regulação 3, 5 e 7 da célula hospedeira, acredita-se que esta interação induz a degradação dos fatores de regulação através do proteassoma, o que resulta na supressão da resposta de interferon (IFN) tipo I, sendo assim NSP1 é considerada uma proteína antagonista de INF (ARNOLD, BARRO, PATTON, 2013).

1.4.2.2. NSP2

Dependendo da origem do rotavírus ela pode ser codificada pelo segmento 7, 8 ou 9. Possui atividade nucleotídeo trifosfatase (NTPase). Em células infectadas é expressa em grande volume e tem atividade na replicação do RNA, interagindo com a RNA-polimerase. Pontua-se que esteja envolvida na virulência e no encapsulamento do RNA, sendo definida como uma enzima multifatorial envolvida nas diversas funções do vírus (ESTES, COHEN, 1989; KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001, HU et al.; 2012).

Juntamente com NSP5 e VP2, está diretamente envolvida na formação do viroplasma, que são inclusões citoplasmáticas formadas nas células infectadas. Estas estruturas dinâmicas são altamente organizadas, atuam como recrutas para os componentes

intermediários da replicação viral, empacotamento do genoma viral no início da montagem da capsídeo intermediário e nos primeiros estágios da montagem das DLPs (FABBRETTI et al., 1999; PATTON et al., 2006).

1.4.2.3. NSP3

Assim como a NSP2, a NSP3 pode ser codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9 dependendo da origem do vírus (ESTES, COHEN, 1989). No rotavírus do grupo A, a proteína não estrutural NSP3 desempenha um papel importante na expressão de proteínas virais, através do fator de iniciação eucariótica 4G (eIF4G) e por uma sequência poli(A). O domínio amino-terminal da NSP3 interage com uma sequência 3' do RNAm viral e o domínio carboxi-terminal interage com o eIF4G, encaminhando-se para os ribossomos para a síntese de proteína (PIRON et al., 1998).

1.4.2.4. NSP4

A NSP4 é uma glicoproteína transmembrana codificada pelo segmento 10 que serve como um receptor para partículas novas e está envolvida na morfogênese das partículas virais no retículo endoplasmático da célula hospedeira. Também tem envolvimento na fisiopatologia da doença diarreica causada pelo rotavírus. Está diretamente envolvida no aumento da concentração de cálcio intracelular nas células hospedeiras, o que resulta na liberação de cloro e água para o meio extracelular, agindo como uma enterotoxina (BUGARCIC, TAYLOR, 2006; KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001). Já foi visto que anticorpos contra a proteína NSP4 podem reduzir a gravidade da diarreia em camundongos, sugerindo que uma resposta imune a NSP4 poderia modular a infecção causada por rotavírus (VIZZI et al., 2005).

1.4.2.5. NSP5

A proteína NSP5 é uma fosfoproteína glicosilada que se auto-organiza em dímeros, é codificada pelo segmento 11, possui atividade quinase e a sua hiperfosforilação envolve uma cascata de eventos iniciados pela atividade NTPase da NSP2. A proteína tem ligação ao RNA, tem papel importante na replicação viral, interage com NSP2 e NSP6 na formação de viroplasma (BLACKHALL et al., 1998).

1.4.2.6. NSP6

NSP6 é codificada de um modo alternativo na ORF do segmento 11, é conhecida por interagir com NSP5 na formação de viroplasma e interage com o RNA na replicação viral (KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001). A NSP6 possui 12kDa, é a proteína menos estudada do vírus e não são todas as cepas de rotavírus que expressam esta proteína (RAINSFORD, MCCRAE, 2007; HU et al.; 2012).

1.5 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ROTAVÍRUS

Os rotavírus podem manter-se infecciosos no ambiente por dias ou meses, sendo estáveis a temperatura de até 56°C, porém o ambiente ideal para manutenção de sua viabilidade são em temperaturas baixas (4°C a 20°C), baixa umidade, faixas de pH de 3,0 a 9,0, proteção contra raios ultravioleta, e nestas condições, quando estabilizadas com CaCl₂, mantém sua infectividade por vários meses. Como as partículas virais não possuem envelope, a integridade das partículas são geralmente resistentes à exposição a éter, clorofórmio ou desoxicolato (KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001). O cálcio é necessário para a estabilidade das partículas por meio da estabilização da glicoproteína VP7. Assim os agentes quelantes de cálcio, como EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e o EGTA (ácido etilenoglicol tetra-acético) inativam a infectividade viral. O álcool (95%) também atua no poder infeccioso do rotavírus através da remoção do capsídeo externo, além dos desinfetantes que contenham fenóis, formalina e cloro (ESTES, 2001).

1.6 TRANSMISSÃO E PATOGÊNESE

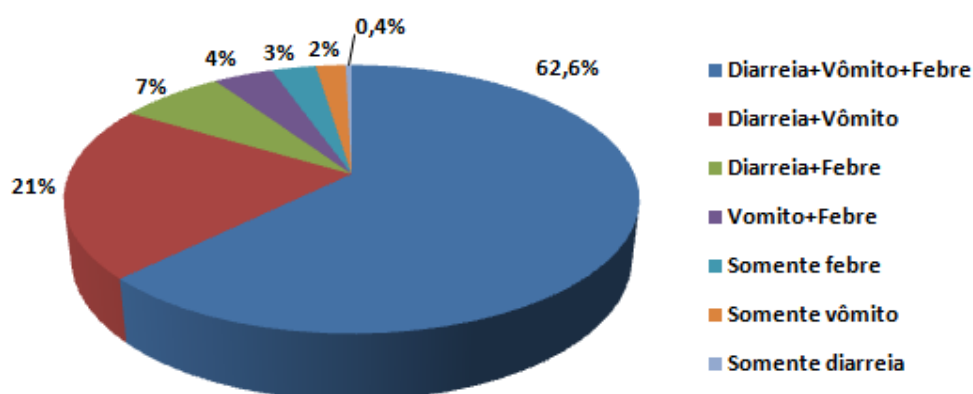
A transmissão de rotavírus ocorre pela via fecal-oral, por contato direto entre pessoas infectadas ou através de fômites, água, alimentos ou ambientes contaminados. A transmissão também pode ocorrer pela via respiratória, porém esta é menos frequente. A resistência à inativação física, a capacidade de rotavírus em sobreviver em várias superfícies e o grande número de partículas virais eliminadas nas fezes contribuem para uma transmissão eficiente do rotavírus humano pela via fecal-oral. O alto poder de infecciosidade deve-se ao fato de que um paciente infectado pode excretar 3×10^{11} partículas infecciosas por mL de fezes (3×10^{11} PFU/mL, Unidade Formadora de Placa), sendo que aproximadamente 300 PFU/mL

já possuem capacidade de infectar um ser humano (BISHOP, 1996; PARASHAR et al., 1998; KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001).

Ainda sobre a transmissão, os rotavírus que infectam animais podem ser fontes de infecção para humanos. Podem ocorrer rearranjos genéticos (“reassortments”) com troca de segmentos do genoma entre diferentes estirpes, assim uma cepa animal pode sofrer um rearranjo com uma cepa humana gerando um novo vírus capaz de infectar o humano (NAKAGOMI, NAKAGOMI, 1993; RAMIG, 2004). Este tipo de transmissão é rara na maioria dos países, mas já houve relatos de transmissão no Brasil (GOUVEA, SANTOS; 1999) e na Índia (DAS et al, 1993), onde houve troca de genes entre uma cepa do origem bovina e uma cepa humana.

O período de incubação da GA causada por rotavírus geralmente é em torno de dois dias, na fase aguda da doença a transmissão é mais acentuada (ESTES, COHEN, 1989). A apresentação clínica da GA causada por rotavírus não é específica, ela geralmente se caracteriza pelo início abrupto dos sintomas, com vômitos e febre alta, sobrevivendo diarreia profusa, aquosa e com aspecto gorduroso (KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001). Quando não há um suporte adequado no tratamento há a continuidade do quadro diarreico, instala-se a desidratação isotônica e, em condições de agravamento desta, decorrendo o óbito (KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001). Alguns fatores têm sido associados a maior gravidade dos casos clínicos, como o estado nutricional, a desidratação e a idade inferior à 2 anos (BINKA et al, 2003; ODIMAYO et al, 2008). Staat e colaboradores (2002) realizaram um estudo com crianças hospitalizadas devido à GA causada por rotavírus, destas 63,6% apresentaram vômito, febre e diarreia e apenas 0,4% apresentaram apenas diarreia, como representado na figura 3.

Figura 3 - Frequência dos sintomas em crianças hospitalizadas com GA por rotavírus



(Adaptada de SAAT et al.; 2002).

A compreensão da patogenia da diarreia causada por rotavírus vem de modelos animais, a gravidade e a localização da infecção difere entre as espécies de animais e entre os estudos. As alterações patológicas são na maioria das vezes são limitadas ao intestino delgado, as lesões ou alterações histológicas são discretas e a inflamação é geralmente leve em comparação aos outros patógenos intestinais (RAMIG, 2004).

O processo que conduz a diarreia é iniciado quando a partícula viral se liga e infecta os enterócitos, são as células que recobrem as vilosidades intestinais, possuem funções digestivas, de absorção e sintetizam uma série de dissacaridases e peptidases (LUNDGREN, SVENSSON, 2001).

A replicação viral ocorre no citoplasma dos enterócitos, sugerindo que estas células expressem fatores que favorecem a replicação do vírus, após a replicação, as partículas infecciosas são liberados no lúmen intestinal. Durante a multiplicação ocorre a morte dos enterócitos infectados, estes são substituídos por células da cripta, que são células imaturas e possuem capacidade reduzida de absorção. Eventos intracelulares devido a ligação e internalização da partícula viral, envolvendo a proteína NSP4, causam a liberação de cálcio do retículo endoplasmático, esse aumento do cálcio intracelular desencadeia uma série de processos celulares, como inibição do sistema de cotransporte de sódio e expressão reduzida das dissacaridases, conduzindo a uma diarreia por má absorção, através da redução da capacidade absorptiva do epitélio intestinal. A má absorção juntamente com diminuição na síntese de dissacaridases aumenta o trânsito intestinal, o bolo fecal não é digerido e o colón não absorve. Acarretando em perdas de água e eletrólitos como, sódio, cloreto, potássio, e

bicarbonato, instala-se quadro de desidratação (RAMIG, 2004; KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001).

As infecções por rotavírus podem ser assintomáticas, nestes casos as estirpes de vírus podem ser atenuadas, particularmente por meio de passagem em cultura de células, os vírus também se adaptar em algumas espécies. As infecções assintomáticas geralmente são em pessoas adultas, devido maior gama de anticorpos adquiridos ao longo da vida (RAMIG, 2004).

Além do intestino alguns estudos demonstraram partículas virais em outros órgãos, Adams e Kraf (1963) realizaram um dos primeiros estudos para avaliar a infecção por rotavírus e perceberam que os camundongos que foram infectados oralmente tiveram a propagação do vírus para outros órgãos como, pulmões, fígado, baço, rim, bexiga e cérebro. Uma vez que a maioria destes órgãos são altamente vascularizados sugeriu-se que a presença nestes tecido reflete a disseminação viral pela circulação sanguínea, estes achados raramente são encontrados em humanos e estão relacionados principalmente com estado imunológico da pessoa (GILGER et al., 1992, RAMIG, 2004).

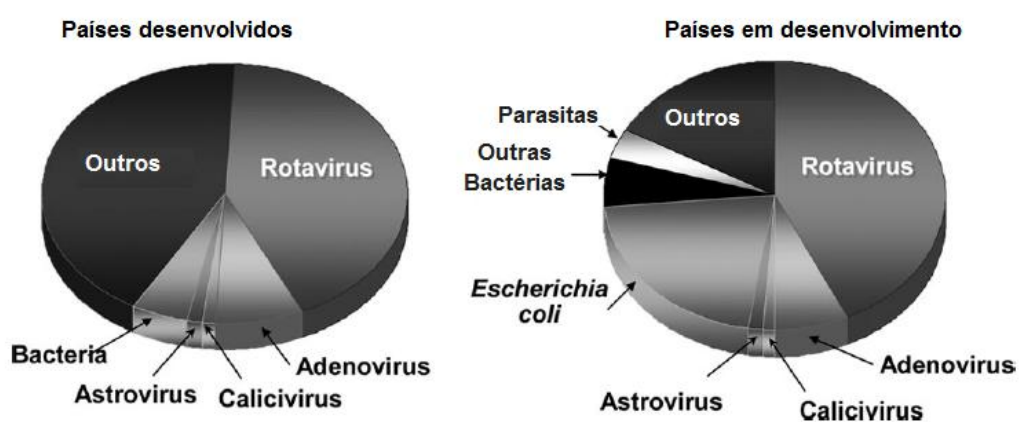
1.7 EPIDEMIOLOGIA DO ROTAVÍRUS

As GAs causadas por rotavírus constituem um grave problema de saúde pública, a doença esta associada a aproximadamente 2 milhões de hospitalizações, 25 milhões de atendimentos de saúde e 111 milhões de episódios de diarreia em crianças jovens a cada ano no mundo todo (PARASHAR et al, 2006).

No ano de 2004, a OMS estimou 527.000 mortes (faixa de 475.000-580.000) em crianças menores de cinco anos devido diarreia causada por rotavírus, o que representa aproximadamente 1440 crianças por dia (PARASHAR et al., 2009). Mais recentemente, Tate e colaboradores (2012) realizaram uma revisão sistemática de estudos sobre epidemiologia de rotavírus, nesta foram incluídos dados de 65 países. As taxas de detecção de rotavírus foram estimadas para crianças de até cinco anos de idade em 12% a 68%, com média de 39%. Estimou-se que em todo o mundo, a cada ano, 453.000 crianças menores de cinco anos idade morrem em consequência da rotavirose, ou seja, uma de cada 260 crianças nascidas a cada ano morrem antes de completar cinco anos em decorrência da doença causada por rotavírus.

A participação do rotavírus frente as demais etiologias de GA é semelhante entre as crianças dos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Na figura 4 pode-se observar que para rotavírus não há diferença na prevalência em ambos os países, diferentemente de outros patógenos como bactérias e parasitas que são mais frequentes em países em desenvolvimento (BERNSTEIN, 2009).

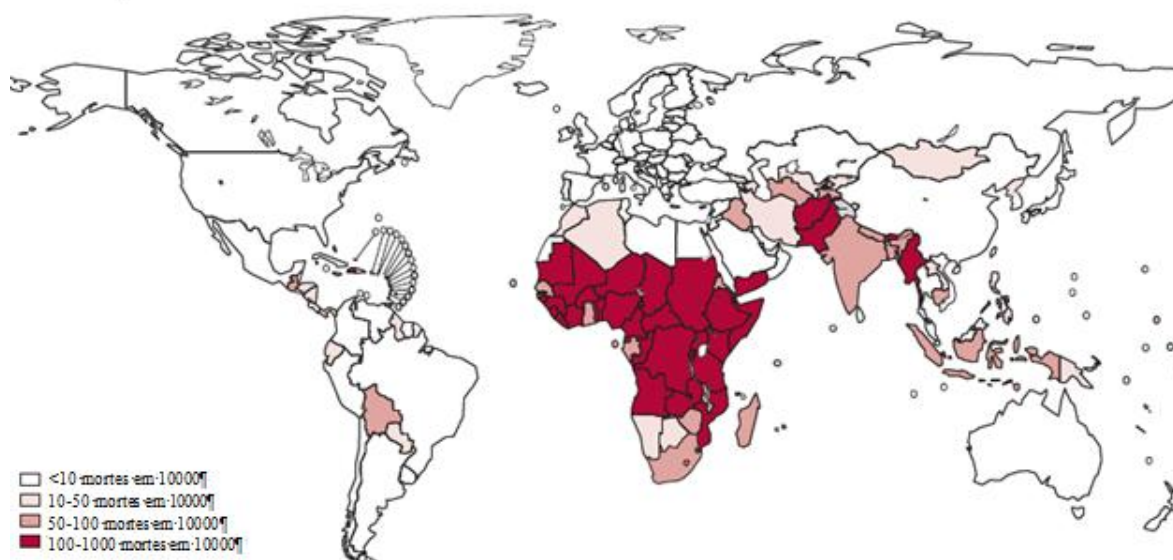
Figura 4 - Agentes etiológicos causadores de GA em países desenvolvidos e em desenvolvimento



(Adaptada de BERNSTEIN, 2009).

Embora a proporção de rotavírus em países desenvolvidos e em desenvolvimento não apresentem diferenças, observa-se que a mortalidade é bem mais acentuada em países em desenvolvimento. Esta relação deve-se a inúmeros fatores incluindo acesso limitado aos serviços de saúde, desnutrição, início mais precoce da infecção e as infecções mistas envolvendo rotavírus e outros patógenos gastroentéricos (PARASHAR et al., 2009). A maioria das mortes ocorrem em países da África e da Ásia, somente a Índia, por exemplo, representa 20% do total das mortes, mas ainda as taxas mais altas de mortalidade são nos países da África subsariana, como pode ser visualizado na figura 5 (TATE et al., 2012).

Figura 5 - Países com maior mortalidade em crianças menores de cinco anos de idade



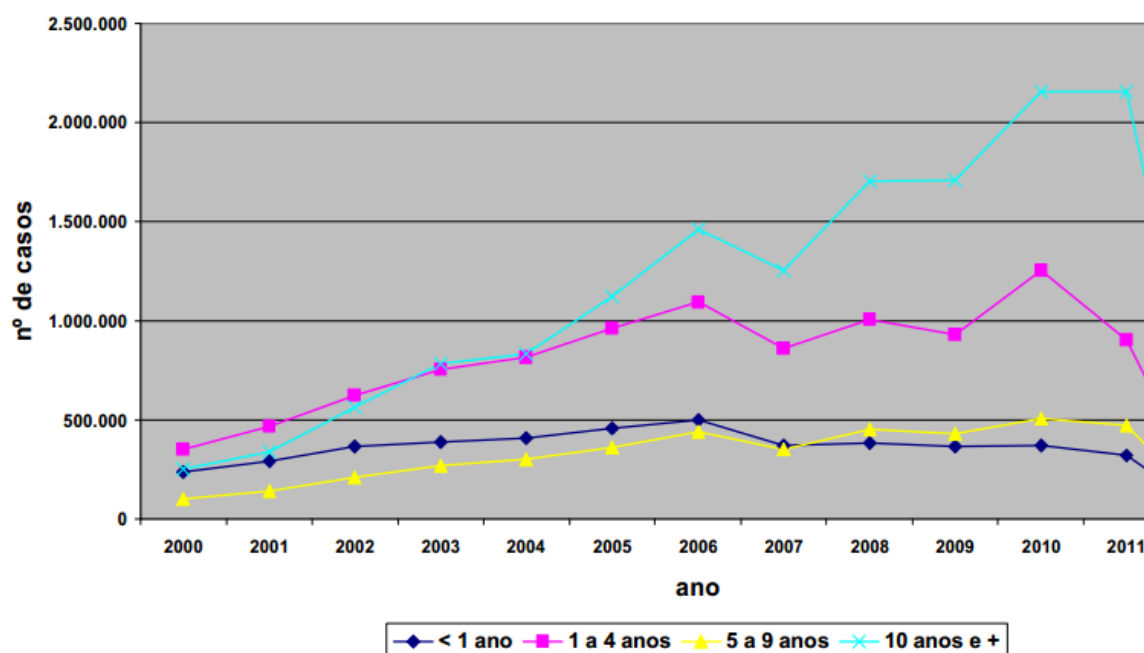
(Adaptada de TATE et.al 2012).

Os países em desenvolvimento representam aproximadamente 86% de todas as mortes devido à infecção causada por rotavírus. Somente a Índia, Nigéria, China, Paquistão, Etiópia e República Democrática do Congo representam mais de 50% de todas as mortes associadas a doença diarreica causada pelo rotavírus (PARASHAR et al., 2009).

Estudo envolvendo 22 países da América Latina, inclusive o Brasil, demonstrou incidência de 24,3% para rotavírus, o que representa 170.000 crianças infectadas por ano (LINHARES et al., 2011). No Brasil, estimou-se que rotavírus já foi responsável por 3.525.053 episódios de diarreia, 655.853 consultas médicas, 92.453 hospitalizações e 850 mortes de crianças menores que cinco anos de idade por ano (CONSTELA et al, 2008; SARTORI et al., 2008).

Dados gerais de diarreia, do sistema de Monitorização da Doença Diarreica Aguda do Ministério da Saúde (MDDA), apontam que entre os anos 2000 a 2011, ocorreram 33.397.413 casos de doença diarreica aguda no Brasil. Para a região sul foram 3.252.423 e no Paraná 1.419.895 casos. Na figura seis está representando o número de casos de doença diarreica no Brasil de acordo com a faixa etária. Pode-se observar que na faixa etária menor que um ano de idade houve redução no número de casos a partir do ano de 2006 (MDDA, 2012). Foram notificados 9.812 casos suspeitos de rotavírus, sendo 2.347 confirmados, o que representa uma positividade geral de 23,9%, mas cabe ressaltar a positividade varia de acordo com as regiões do Brasil (MS, 2012).

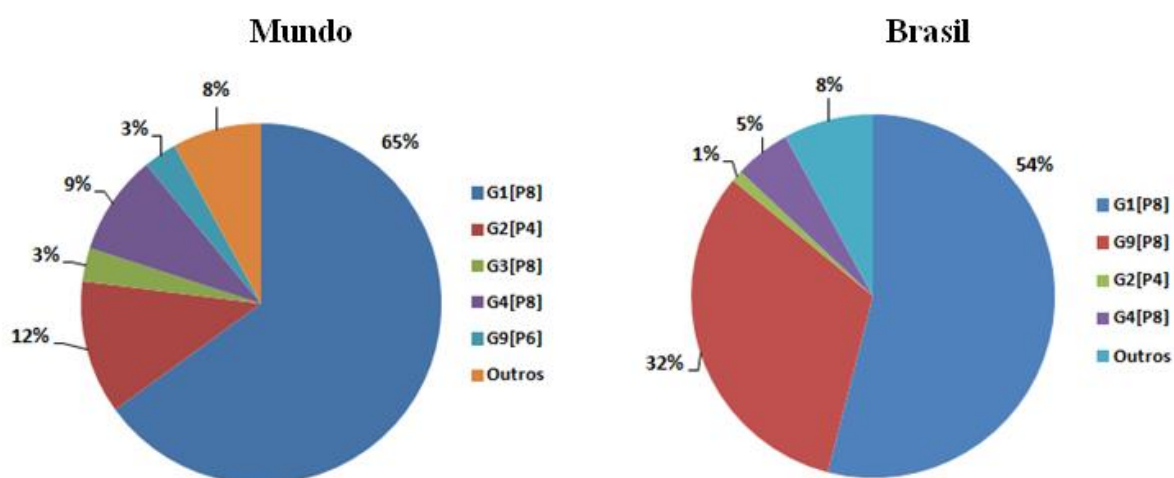
Figura 6 – Números de casos de doença diarreica no Brasil do ano 2000 a 2011



(Adaptado de Sistema de Monitorização de Doenças Diarreicas Agudas, Ministério da Saúde, 2012).

Diante destes dados sobre infecções causadas por rotavírus em todo o mundo e da diversidade genética do vírus, o conhecimento da epidemiologia molecular do rotavírus também é de grande relevância. Dos vinte três genótipos G e trinta e um P descritos, as combinações mais frequentes encontradas em todo o mundo são G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8], G12P[6] e G12P[4] (MATTHIJNSSENS et al., 2010). Os genótipos G1, G2, G3, G4 combinados com P[4], P[6] e P[8], representam mais de 87% de todas as cepas analisadas no mundo todo (DENNEHY, 2008). No Brasil estudos de epidemiologia molecular de rotavírus apontam que os principais genótipos são G1P[8], G9[P8], G2[P4] e G4[P8], como representado na figura 7 (GURGEL et al., 2008).

Figura 7 – Genótipos mais frequentes no mundo e no Brasil



(Adaptada de DENNEHY, 2008; GURGEL et al., 2008).

No Brasil, a frequência destes principais genótipos diferem de acordo com a região, Munford e colaboradores (2009) realizaram um estudo de vigilância epidemiológica para avaliar a circulação de diferentes genótipos de rotavírus. Para este estudo foram coletadas amostras de fezes de crianças menores que cinco anos de idade, hospitalizadas com GA causada por rotavírus, nas capitais São Paulo, Salvador, Goiânia e Porto Alegre, entre agosto de 2005 e agosto de 2006. A circulação de genótipos foi diferente entre as regiões, G2P[4] foi predominante em Goiânia (58,5%) e Salvador (48,9%), enquanto o genótipo G9P[8] predominou em São Paulo (48,9%) e G1P[8] em Porto Alegre (75,0%).

No Paraná, dois estudos apontam a circulação de diferentes genótipos, na cidade de Curitiba, o genótipo de maior prevalência foi G4P[8] (38,9%), seguido de G1P[8] (30,5%) e G9P[8] (13,9%), sendo que o genótipo G2P[4] representou somente 6,9% (PEREIRA et al., 2011). Nas cidades de Ponta Grossa, Londrina e Assaí os genótipos G1, G2 e G9 representaram 37,5%, 54,1%, e 8,3% e o genótipo P[4] e P[8] 56,2% e 43,7%, respectivamente (NOZAWA et al., 2010). Estes estudos ressaltam a relevância de estudos da epidemiologia molecular em um país com grande diversidade geográfica como o Brasil.

1.8 VACINAÇÃO

Como a maioria dos rotavírus compartilham os principais componentes antigênicos de VP6, sempre se considerou a possibilidade da imunização através do uso de vacinas contendo cepas isoladas de rotavírus seja de animais ou de humano. As estratégias vacinais devem considerar que a história natural das infecções por rotavírus revela ocorre nos primeiros meses de vida e, geralmente, também apresenta maior gravidade. A medida que a criança vai sendo exposta repetidas vezes à diferentes cepas de rotavírus a gravidade dos casos tendem a diminuir concomitante a aquisição da imunidade (GLASS et al., 2005).

Estudos com vacinas contra rotavírus iniciaram na década de 1980 com o desenvolvimento de vacinas de primeira geração de origem animal. Os resultados não foram satisfatórios, pois estas não ofereceram proteção contra os genótipo mais importantes. Posteriormente, surgiram vacinas de segunda geração de natureza antigênica polivalente e com rearranjo genético, desenvolvidas na tentativa de ampliar a proteção contra os genótipos mais prevalentes, G1 a G4 (VRANJAC, 2006; VESIKARI, 2012).

A primeira vacina contra o rotavírus foi licenciada somente em 1998, a RotaShield® (Wyeth Lederle Vaccines, Philadelphia) nos EUA. A vacina foi uma composição tetravalente, com rearranjo símio e humano, de administração oral e em esquema de aplicação de três doses, aos 2, 4 e 6 meses de idade, resultando em importante redução das hospitalizações (83%) devido GA causada por rotavírus (VRANJAC, 2006; TATE et al., 2009). Contudo, em julho de 1999, a vacina foi retirada do mercado após a aplicação de cerca de 1,2 milhões de doses em 600.000 lactentes, pelo fato de alguns estudos terem demonstrado a associação desta vacina com casos intussuscepção intestinal em crianças que receberam pelo menos uma dose da vacina (VESIKARI, 2012).

No ano de 2006, foram licenciadas duas vacinas orais contra rotavírus e estas são recomendados pela OMS para uso em todos os países, em particular nos países com alta mortalidade por diarreia em crianças menores de 5 anos. Os dois imunógenos são a Rotateq® (Merck Sharp Dohme, EUA) e a RotaRix® (GlaxoSmithkline, Bélgica). A RotaRix®, ou vacina oral de rotavírus humano (VORH), é uma preparação monovalente de origem humana, com especificidade antigênica G1 e P[8]. Como o alvo da vacina é G1 e P8 seu objetivo é fornecer uma imunidade protetora específica para os genótipos mais comuns e de maior circulação em seres humanos (VESIKARI, 2012). A Rotateq® compreende uma preparação pentavalente de origem bovino-humana, sua composição inclui os tipos G1, G2,

G3, G4 e P1, tratando-se de produto não-reatogênico e altamente eficaz (VESIKARI et al, 2006). A vantagem da Rotateq[®] de conter vários genótipos na sua composição aumentando a imunidade cruzada, provavelmente elevando o nível de anticorpos séricos IgA contra diferentes antígenos do grupo VP6. Três doses desta vacina são recomendados para serem administradas aos 2, 4 e 6 meses. A eficácia das três doses da vacina especificamente para os genótipos G1 a G4 foi de 73% para GA de qualquer gravidade e de 98% para GA grave, reduzindo em até 86% o número de consultas médicas e em 96% número de hospitalizações devido GA por rotavírus (CORTESE, PARASHAR, 2009).

No Brasil, já no mês de março de 2006, foi incluída a VORH no Programa Nacional de Imunização (PNI), em duas doses, sendo a 1ª dose aos dois meses de vida e a 2ª aos quatro meses de vida, atendendo um intervalo preconizado de 8 semanas entre as doses, ou seja, crianças com idade de 1 mês e 15 dias a 3 meses e 7 dias podem receber a 1ª dose e a 2ª dose aos 4 meses de idade (MS, 2012).

Logo após a introdução da vacinação, alguns estudos já demonstraram o benefício da prática de imunização contra rotavírus na redução de infecção, hospitalização (CARVALHO-COSTA et al., 2009; SÁFADI et al, 2010) e de mortalidade por diarreia associada ao rotavírus (WALKER et al., 2012). A eficácia da vacina foi diferente em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Em crianças europeias, a eficácia da VORH foi de 90,4% na prevenção de diarreia grave e 96,0% na admissão hospitalar devido GA causada por rotavírus (VESIKARI et al., 2007). Na África do Sul e Malawi a eficácia na prevenção de diarreia grave foi de 72% e 49% respectivamente, (MADHI et al., 2010). Em El Salvador 76% (de PALMA et al., 2010) e na Bolívia de 77% (PATEL et al., 2013).

O maior estudo caso-controle realizado em cinco regiões do Brasil entre os anos 2008 a 2011, avaliou a eficácia específica e geral da VORH. A eficácia para G1P8 foi de 89% e para o genótipo prevalente neste estudo G2P4 foi de 76%, indicando um grau importante de proteção cruzada da vacina, e uma eficácia parecida encontrada em outros países (ICHHARA et al., 2014), e também nos estudos menores realizados anteriormente, como de Belém onde a eficácia para G2P4 foi de 75,4% (JUSTINO et al.; 2011) e em Recife 77% (CORREIA et al.; 2010)

Dados gerais da vacinação estimam que a VORH pode impedir 1.804 mortes associadas com gastroenterite devido ao rotavírus, 91.127 hospitalizações e 550.198 consultas ambulatoriais ao ano no Brasil, acarretando em uma redução de 76% da carga global de saúde devido GA por rotavírus (Constenla et al.; 2008).

Contudo, importantes alterações na epidemiologia molecular do rotavírus A tem sido demonstrada de forma coincidente ao início da vacinação no Brasil, sugerindo a hipótese de que a vacina monovalente estaria selecionando a circulação de cepas virais. Em recente revisão sistemática da literatura, Ambrosini e Carraro (2012) avaliaram o impacto da introdução da vacina contra rotavírus no Brasil e confirmaram a redução nas taxas de infecção, hospitalização e mortalidade comparando os dados dos anos anteriores e posteriores à vacinação. Entretanto, também descreveram o predomínio do genótipo G2 em diferentes regiões do país após o ano de 2006. No Nordeste, foi demonstrado que o genótipo G2, encontrado em 1,4% das amostras em 2005, passou a uma incidência de 44% em 2006 e 95% em 2007 (GURGEL et al., 2007). Em São Paulo, o estudo de Morillo (2010) demonstrou que no ano de 2004 houve uma prevalência para os genótipos G9P8 e G1P8, em 2005 para G1P8 e no ano de 2007 prevaleceu o G2P4. Da mesma forma, no Rio de Janeiro o genótipo G2 teve o perfil de predomínio de 96% em 2007 (CARVALHO et al., 2009). No estado do Paraná, dois estudos demonstraram o predomínio de G2 no período pós-vacinal, na cidade de Curitiba (PEREIRA, 2013), e nas cidades de Ponta Grossa, Assaí e Londrina (NOZAWA et al., 2010).

Há uma discussão sobre se o uso da vacina leva à substituição da prevalência de diferentes genótipos, a alta eficácia tanto para o genótipo G1P8 e G2P4 sugere que a predominância de G2P4 está relacionada com um padrão cíclico na circulação de cepas rotavírus que vem ocorrendo no Brasil (ICHIHARA et al.; 2014), como em outros países, onde foi demonstrado uma maior circulação de genótipos considerados incomuns em humanos anteriormente, como G5, G8, G9, G10 e P[6] (LEITE, CARVALHO-COSTA, LINHARES, 2008).

1.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A GA causada por rotavírus não produz sinais e sintomas únicos desta patologia, as manifestações clínicas podem ser confundidas com outras etiologias, mesmo virais ou bacterianas. Assim, torna-se necessário a confirmação do diagnóstico utilizando-se de métodos laboratoriais e muitas metodologias já foram desenvolvidas para este propósito (KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001). A maioria das estirpes de rotavírus pode ser cultivada em cultura celular, no entanto, o procedimento é fastidioso e acaba sendo restringido para os laboratórios de pesquisa (RABONI et al., 2002). Assim, a maioria das

metodologias utilizadas para o diagnóstico de rotavírose utilizam o princípio da detecção da partícula viral, de antígenos ou do seu material genético. A maioria destas metodologias são eficientes, pois o rotavírus possui características favoráveis, principalmente devido à excreção de grandes quantidades de vírus e tempo de excreção relativamente longo (de cinco a sete dias) no paciente infectado (KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001).

O primeiro método utilizado para detecção de rotavírus foi a ME, esta metodologia apresenta uma grande vantagem que é a elevada especificidade, pois a aparência morfológica do rotavírus torna-se distinguível facilmente. As desvantagens da ME estão relacionadas com tempo da análise para grandes números de amostras, necessidade de pessoal treinado e com custo elevado do equipamento, assim este método não é usualmente utilizado em laboratório de rotina (ESTES, COHEN, 1989; KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001). A técnica de imunomicroscopia eletrônica tem as mesmas características da ME, porém nesta usa-se anticorpos específicos para o rotavírus, o que aumenta sua especificidade. Estas duas técnicas são utilizadas para resolver discrepâncias de resultados obtidos por outros métodos, já que estas permitem a detecção em 90% ou mais das amostras positivas (DENNEHY, GAUNTLETT, SPANGENBERGER, 1990; PEREIRA et al., 1983).

Os métodos mais utilizados rotineiramente para o diagnóstico do rotavírus são embasados na detecção de antígenos de rotavírus em amostras de fezes. Dentre estes, os ensaios imunoenzimáticos (EIE), imunocromatográficos e ensaios de aglutinação em látex são os princípios mais empregados nos testes laboratoriais de rotina (DUSETTY et al., 2010). Os EIE permitem automação, como é o caso de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), podendo ser realizadas pesquisas em larga escala e em curto período de tempo, sendo também altamente sensível e específico, considerado favorável para triagem de um grande número de amostras de fezes (KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK; MOMENZADEH et al., 2008; PEREIRA et al., 2011).

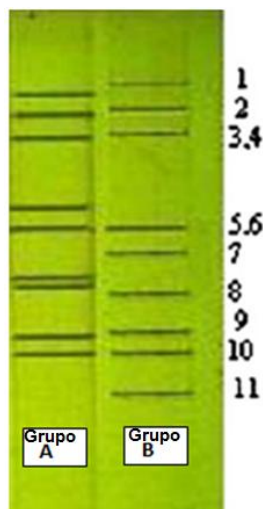
Partículas de látex revestidas com anticorpo específico podem ser aglutinadas na presença do antígenos e serem facilmente observadas a olho nu. Este ensaio é rápido, tem sensibilidade equivalente à ME e uma especificidade superior a 90% (ZUCKERMAN et al., 2004; PEREIRA et al., 2011). Quando comparadas as metodologias EIE, imunocromatográficos e a aglutinação em látex, estes apresentam sensibilidades de 96%, 68% e 99% e especificidades de 98%, 92% e 96%, respectivamente (WILHELMI et al., 2001).

As opções de produtos comerciais é bastante vasta no que se refere aos testes de detecção de antígenos, na sua maioria utilizam anticorpos monoclonais ou policlonais direcionados à proteína VP6, porém podem apresentar resultados falsos-positivos, sendo necessário a avaliação contínua da qualidade dos reagentes fornecidos pelo fabricante (KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001).

As técnicas moleculares para detecção de rotavírus apresentam grandes vantagens relacionadas com sensibilidade e especificidade, porém devido sua complexidade e alto custo são utilizadas principalmente laboratórios de pesquisa. As técnicas mais utilizadas são a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE - *Polyacrylamide gel electrophoresis*) e a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), estas podem ser utilizadas para a detecção viral e também para a diferenciação entre variantes genéticas (PEREIRA et al., 1983; GOUVEA et al. 1990).

A técnica da PAGE consiste basicamente na migração diferencial dos segmentos de genes virais em campo elétrico, onde a velocidade de deslocamento das moléculas depende da carga elétrica líquida de sua superfície externa, seu tamanho e forma. A revelação de bandas é feita com corantes, mostrando tamanho, intensidade da cor e distância do ponto de aplicação, as quais são comparadas com amostras conhecidas (GENTSCH et al., 2009; MOMENZADEH et al., 2008). Os segmentos de ácidos nucleicos de rotavírus podem ser visualizados diretamente em PAGE corada com nitrato de prata, os íons formam complexos estáveis com ácidos nucleicos, esta coloração é sensível mesmo para pequenas quantidades de material genético (HERRING et al., 1982). Na PAGE, a migração do RNA é diferente conforme os grupos do rotavírus (exemplificado na figura 8). No grupo A há quatro grupos de migração, sendo que no primeiro há quatro segmentos (1, 2, 3, 4), o segundo possui dois (5 e 6) o terceiro com três (7, 8 e 9) e o quarto com dois (10 e 11), resultando no padrão de migração (4:2:2:3), perfil curto. Já por exemplo no grupo B, a migração de alguns segmentos ocorrem mais rapidamente como os segmentos 5 e 6, já o segmento 7 ocorre mais lentamente que no grupo A, resultando em padrão de migração diferente (4:2:3.2) perfil longo (MALIK et al., 2011). O PAGE possui uma sensibilidade e especificidade de 91,2% e 100%, respectivamente, quando comparada com EIE (MOMENZADEH et al., 2008). O método da PAGE pode ser utilizado para diagnosticar infecções por rotavírus do grupo A, no entanto, este método é muito trabalhoso e demorado, sendo estas as principais desvantagens da metodologia (GENTSCH et al., 2009).

Figura 8 – Perfil de migração em PAGE para o rotavírus do grupo A e do Grupo B.



Perfil de migração dos onze segmentos de RNA para o grupo A 4:2:2:3 (perfil curto) e para o Grupo B 4:2:3:2, (perfil longo) de rotavírus, em PAGE corado com nitrato de prata (Adaptado de MALIK et al., 2011).

Devido à grande diversidade genética do rotavírus, estudos da epidemiologia molecular são necessários para acompanhar possíveis mudanças da circulação dos genótipos e avaliar a eficácia das vacinas disponíveis. A OMS enfatiza a necessidade de conhecimento prévio da prevalência dos genótipos circulantes. O desafio atual está na garantia de correlação de proteção gerada pela imunização utilizando uma vacina monovalente frente à infecção pelos demais genótipos circulantes, assim como o impacto clínico resultante da infecção por genótipos distintos em indivíduos vacinados (CORTESE, PARASHAR, 2009).

Assim, a aplicação da metodologia de RT-PCR possibilita a classificação genética do rotavírus, além de sua detecção em amostras clínicas. Nesta metodologia, a utilização de primers específicos complementares às regiões dos genes que codificam as proteínas VP6, VP7 e VP4, possibilitam a classificação das cepas de em grupo e genótipos P e G, respectivamente, de modo extremamente sensível (KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001). Algumas desvantagens da metodologia, estão relacionadas com a sensibilidade da amplificação que tende a ser inversamente relacionados com a sua especificidade, muitas vezes a PCR gera produtos inespecíficos, também podem ocorrer falhas relacionadas com os primers da reação devido a uma possível mutação espontânea no seu local de ligação, gerando resultados de cepas não genotipadas. No entanto, pode-se melhorar o resultado da genotipagem através da PCR substituindo a análise de produtos feita através da eletroforese por uma análise com hibridação DNA-DNA, permitindo a detecção inequívoca de sequências alvo independentemente se houver produtos inespecíficos, pois a hibridização

permite o uso de primers de PCR com especificidade mais ampla, permitindo uma amplificação mais sensível e robusta de uma ampla gama de organismos com especificidade de 100% (CHIZHIKOV et al., 2002; LOVMAR et al., 2003).

A OMS enfatiza a necessidade de conhecimento prévio da prevalência dos genótipos circulantes. O desafio atual está na garantia de correlação de proteção gerada pela imunização utilizando uma vacina monovalente frente à infecção pelos demais genótipos circulantes, assim como o impacto clínico resultante da infecção por genótipos distintos em indivíduos vacinados (CORTESE, PARASHAR, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a infecção pelo rotavírus em crianças com gastroenterite de até cinco anos de idade vacinadas ou não no município de Guarapuava, PR.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Padronizar as metodologias moleculares para a detecção e genotipagem do rotavírus A em amostras de fezes;

2.2.2. Investigar a ocorrência de infecção por rotavírus em crianças da comunidade com gastroenterite de até cinco anos de idade atendidas no serviço de saúde do município de Guarapuava, PR;

2.2.3. Realizar a caracterização molecular das amostras de rotavírus circulantes em crianças com gastroenterite no município de Guarapuava, PR;

3 METODOLOGIA

3.1. POPULAÇÃO

Foram incluídas no estudo crianças com até cinco anos de idade que, após atendimento pediátrico em serviço da rede de saúde do município de Guarapuava-PR, tiveram a solicitação para a investigação de etiologia de gastroenterites.

O município de Guarapuava está localizado na região centro-sul do estado do Paraná, tem uma superfície de 3.177,598Km², possui uma população estimada em 175.779 habitantes em 2013, sendo essencialmente urbano, onde cerca de 90% da sua população reside. O clima do município é subtropical úmido, com temperatura média anual de 16°C e com precipitação anual de 1.653,7mm. O índice de desenvolvimento humano é 0,731, está em 78º lugar no ranking do estado (IPARDES, 2013).

As coletas foram realizadas do mês de março de 2011 a fevereiro de 2012. No momento da entrega da amostra clínica no laboratório municipal um membro da equipe de pesquisa abordou os pais ou responsáveis pela criança, explicando o estudo e convidando para sua participação, sua concordância foi formalizada através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). Após, foi realizada a separação de uma alíquota da amostra dentro da área técnica do laboratório municipal para posterior análise. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Unicentro número 156852/2011.

3.2 AMOSTRAS

As amostras frescas de fezes devidamente identificadas em coletor universal estéril foram transportadas sob refrigeração ao laboratório de Virologia da Unicentro. Cada amostra foi diluída para se obter uma suspensão final de 10% em solução salina tamponada em fosfato (PBS pH 7,2), transferidas para microtubos de 1500µL devidamente identificados e armazenadas a -70°C até o momento da análise.

3.3 EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Primeiramente, as suspensões foram descongeladas e submetidas a clarificação por centrifugação em Microcentrífuga (Spinlab, Brasil) a 3500 rotações por minuto (rpm) por 30 minutos. Após, 200µL do sobrenadante clarificado foi utilizado para a extração do RNA viral usando o kit QIAamp RNA viral kit (Qiagen GmbH., Alemanha), conforme as instruções do fabricante. Em seguida, o RNA viral extraído foi utilizado nas reações de RT-PCR.

3.4 TRANSCRIÇÃO REVERSA – RT

Para cada amostra foi gerado o cDNA (ácido dextrorribonucléico complementar), inicialmente através da mistura de 10µL de RNA e 1µL da solução de oligonucleotídeos randômicos a 200ng/µL (Random Primer, Invitrogen, EUA) aquecidos a 80°C por 10 minutos, com posterior resfriamento a 4°C por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionada a mistura de reagentes para a transcrição reversa (tabela 1), constituída por água de grau molecular (equipamento MiliQ, Millipore, EUA), MgCl₂ (Invitrogen, EUA), tampão concentrado 5 vezes (250mM Tris-HCl, pH8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂) desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) dATP, dTTP, dCTP, dGTP, enzima transcriptase reversa “Moloney Murine Leukemia Virus” (MMLV-RT) (Invitrogen, EUA) e inibidor de RNase (Invitrogen, EUA) para um volume final de 25µL. Após a homogeneização, a síntese do cDNA foi realizada em termociclador Multigene TC 9600G (Labnet Laboratory, EUA) a 42°C durante 60 minutos. Após este procedimento, as amostras foram submetidas a ciclos da PCR para amplificação dos genes 9 (VP4) e 4 (VP7) em microtubos separados.

Tabela 1 - Reagentes utilizados na reação de RT

Componentes	Concentração	Volume da reação
Água Mili-Q	-	4,5 µL
Tampão	5X	5µL
MgCl ₂ (Invitrogen®)	50mM	2 µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP	20mM	1 µL
Rnase Out inibitor (Invitrogen®)	40U/µL	0,5 µL
MML-V (Invitrogen®)	200U/µL	1 µL

3.5 AMPLIFICAÇÃO DO GENE VP7

A amplificação do gene VP7 foi realizada através de uma reação em duas etapas de Multiplex-Nested-RT-PCR. Para a primeira amplificação do gene VP7 foram utilizados os primers BEG e END que amplificam um fragmento de 1062pb do gene nove de qualquer linhagem de rotavírus do grupo A. Na segunda amplificação, foi realizada uma reação utilizando primers específicos para os genótipos G1, G2, G3, G4, G5 e G9, considerados mais frequentes. Na tabela 2, estão descritos a sequência dos nucleotídeos utilizados como primers nas diferentes reações de amplificação do gene VP7.

Tabela 2: Primers utilizados na primeira e na segunda amplificação do gene VP7

Primers	Sequência (5'-3')	Referência
BEG	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	Gouvea, 1990.
END	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	
CONG	TAGCTCCTTTTAATGTATGG	
G1	TCTTGTCAAAGCAAATAATG	
G2	GTTAGAAATGATTCTCCACT	Das, 1994.
G3	GTCCAGTTGCAGTGTTAGC	
G4	GGGTCGATGGAAAATTCT	
G5	CATGTACTCGTTGTTACGTC	Gouvea, 1994.
G9	TATAAAGTCCATTGCAC	Das, 1994.

A primeira reação de amplificação foi realizada com a adição de 10µL do cDNA na mistura de reagentes da PCR (tabela 3), contendo água de grau molecular (MiliQ–Millipore, EUA), MgCl₂ (Invitrogen, EUA), tampão para esta reação concentrado 10 vezes (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), primers BEG e END, enzima *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen, EUA), com volume final da reação de 25µL. Após a homogeneização, a amplificação foi realizada em termociclador Multigene TC 9600 G (Labnet Laboratory, EUA), as amostras foram submetidas a 30 ciclos de repetidas variações de temperatura: 94°C por 30 segundos; 50°C por 30 segundos; e 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Em seguida, o produto desta amplificação foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,2%, por uma hora a 140 volts (V).

Tabela 3 - Reagentes utilizados na primeira amplificação do gene VP7

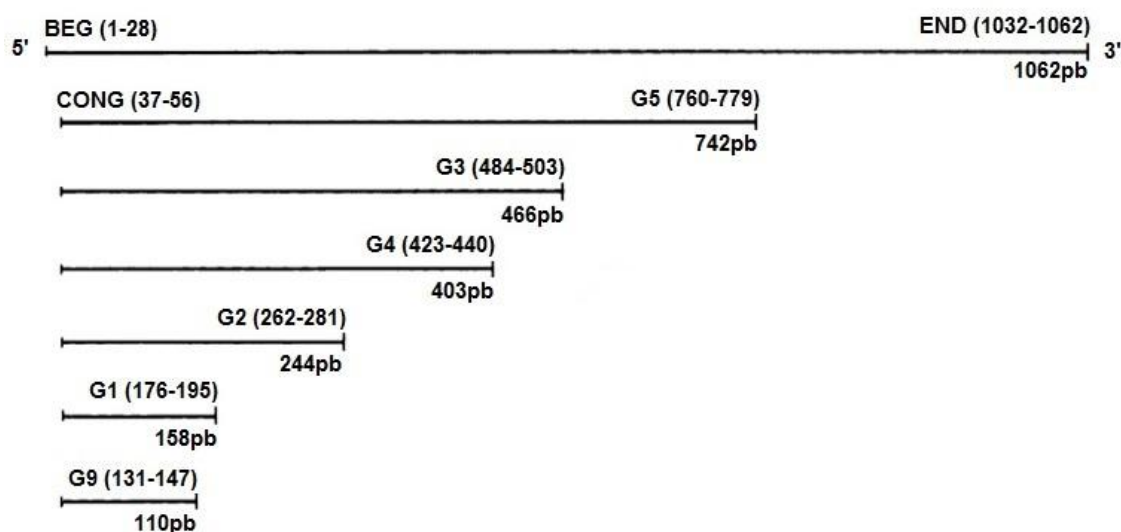
Componentes	Concentração	Volume da reação
Água Mili-Q	-	10,175µL
Tampão	10X	2,5µL
MgCl ₂	50mM	1 µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP	20mM	0,625 µL
BEG	20µM	0,5 µL
END	20µM	0,5 µL
<i>Taq</i> polimerase	5U/µL	0,2µL

Para a segunda amplificação do gene VP7, foi realizada uma reação de Multiplex-Nested-RT-PCR, para determinar os genótipos G. Foram adicionados 2µL do cDNA da primeira amplificação em microtubos contendo a mistura de reagentes para a reação de PCR (tabela 4), composto de água grau molecular (Mili-Q, Millipore, EUA), MgCl₂, tampão dez vezes concentrado, dNTPs, pool de primers contendo o primer consenso CONG e os primers específicos para os genótipos G1, G2, G3, G4, G5 e G9 (tabela 2), enzima *Taq* DNA polimerase. A reação foi processada por 5 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C, 60 segundos a 72°C, com extensão final a 72°C por 10 minutos.

Tabela 4 - Reagentes utilizados para segunda amplificação do gene VP7

Componentes	Concentração	Volume da reação
Água Mili-Q	-	14,8µL
Tampão	10X	2,5µL
MgCl ₂	50mM	2,5µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP	20mM	0,5µL
Pool de primers (ConG, G1, G2, G3, G4, G5 e G9)	10µM	2,5µL
<i>Taq</i> polimerase	5U/µL	0,2µL

Na figura 9 esta representada local de ligação dos primers da amplificação e os tamanhos dos fragmentos gerado na primeira e na segunda amplificação do gene VP7.

Figura 9– Representação dos alvos da Multiplex-Nested-RT-PCR (gene VP7)

Primers utilizados na reação de Multiplex-Nested-RT-PCR, tamanho do fragmentos gerados para cada genótipo e posição de anelamento. Fonte – Autor.

3.6 AMPLIFICAÇÃO GENE VP4

A amplificação do gene VP4 foi realizada em duas reações no formato de Multiplex-Hemi-Nested-RT-PCR. Para a primeira amplificação do gene VP4 foram utilizados os primers CON2 e CON3 (tabela 5) que amplificam um fragmento de 876pb do gene quatro de qualquer linhagem de rotavírus do grupo A. Na segunda amplificação, foi realizada uma reação repetindo o primer CON2 e acrescido os primers específicos para os genótipos P[4], P[6], P[8] e P[9]. Na tabela 5, estão descritos a sequência dos nucleotídeos utilizados como primers nas diferentes reações de amplificação do gene VP4.

Tabela 5 - Primers utilizados para primeira e a segunda amplificação do gene VP4

Primers	Sequência (5'-3')	Referência
CON3	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA	
CON2	ATTTCCGACCATTATAACC	
P[4]	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	Gentsch,
P[6]	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	1992
P[8]	TCTACTTGGATAACGTGC	
P[9]	TGAGACATGCAATTGGAC	

A primeira reação de amplificação foi realizada com a adição de 10 μ L do cDNA a mistura de reagentes da PCR (tabela 6), contendo água de grau molecular (obtida de filtro MiliQ–Millipore, EUA), MgCl₂ (Invitrogen, EUA), tampão concentrado 10 vezes (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), primers (CON2 e CON3), enzima *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen, EUA), em volume final de 25 μ L. Após a homogeneização, a amplificação foi realizada em termociclador Multigene TC 9600G (Labnet Laboratory, EUA), as amostras foram submetidas a 30 ciclos repetidos das temperaturas: 94°C por 30 segundos; 45°C por 30 segundos; e 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final de 72°C por 10 minutos, o produto desta amplificação foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,2%, por uma hora a 140 volts (V).

Tabela 6 – Reagentes utilizados na primeira amplificação do gene VP4

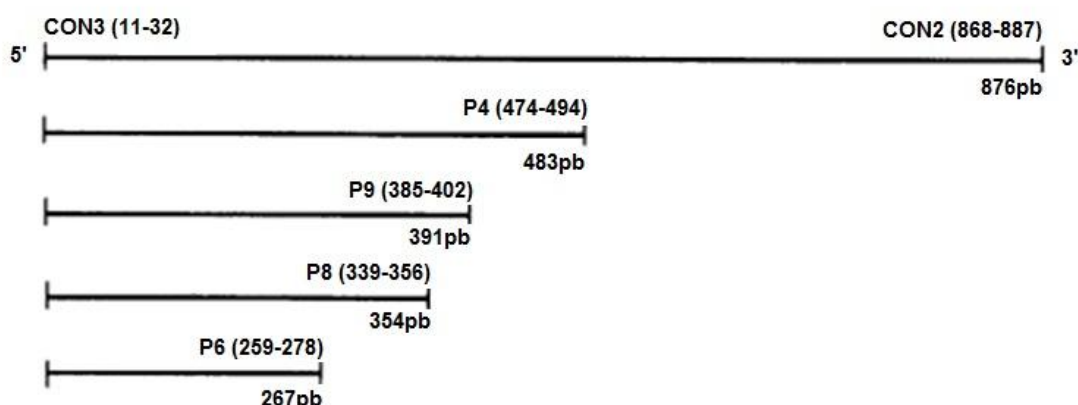
Componentes	Concentração	Volume da reação
Água Mili-Q	-	10,175 μ L
Tampão	10X	2,5 μ L
MgCl ₂	50mM	1 μ L
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP	20mM	0,625 μ L
CON3	20 μ M	0,5 μ L
CON2	20 μ M	0,5 μ L
<i>Taq</i> polimerase	5U/ μ L	0,2 μ L

Para a segunda amplificação do gene que codifica a proteína VP7, foram adicionados 2 μ L do cDNA da primeira amplificação em tubos contendo a mistura de reagentes para a reação de PCR (tabela 7), composto de água grau molecular (Mili-Q), MgCl₂, tampão dez vezes concentrado, dNTPs, pool de primers contendo, o primer consenso Con3 e os específicos para os genótipos P[4], P[6], P[8] e P[9] (tabela 5), enzima *Taq* DNA polimerase. A reação foi processada por 5 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 42°C, 60 segundos a 72°C, com extensão final a 72°C por 10 minutos.

Tabela 7 - Reagentes utilizados na segunda amplificação do gene VP4.

Componentes	Concentração	Volume da reação
Água Mili-Q	-	14,8µL
Tampão	10X	2,5µL
MgCl ₂	50mM	2,5µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP	20mM	0,5µL
Pool de primers (Con3, P[4], P[6], P[8] e P[9])	10µM	2,5µL
Taq polimerase	5U/µL	0,2µL

Na figura 10, esta a localização de ligação dos primers da amplificação e os tamanhos dos fragmentos gerado na primeira e na segunda amplificação do gene VP7.

Figura 10 – Representação dos alvos da Multiplex-Hemi-Hested-RT-PCR (gene VP4)

3.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Após cada amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,2%, diluído em tampão Tris/borato/EDTA - TBE (Tris 0,089M; ácido bórico 0,0089M; EDTA 0,002M pH 8,0), contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen, EUA). O gel foi preparado em cubas de eletroforese horizontal. Um volume de 7,5µl do produto amplificado foi misturado com 2,5µl da solução de corante azul de bromofenol (0,25%; xileno cianol 0,25%; glicerol 30% em água destilada) e aplicado a cada canaleta correspondente. Para cada eletroforese foi reservada a primeira canaleta para aplicação do padrão de peso molecular de 100pb a 1µg/µl (DNA Ladder, Invitrogen, EUA).

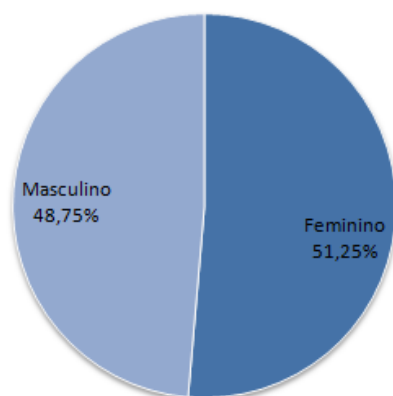
A corrida em cuba horizontal de eletroforese foi realizada utilizando como tampão de corrida TBE 0,5X (Tris 1M; ácido bórico 0,9M; EDTA 0,00M pH 8,4) a uma voltagem de 140V por 60 minutos. A análise do gel foi realizada através da visualização em transiluminador de luz ultravioleta Alphamager HP (Protein Simple, EUA) utilizando o software Alphaview versão 3.4.

4 RESULTADOS

4.1 AMOSTRAS

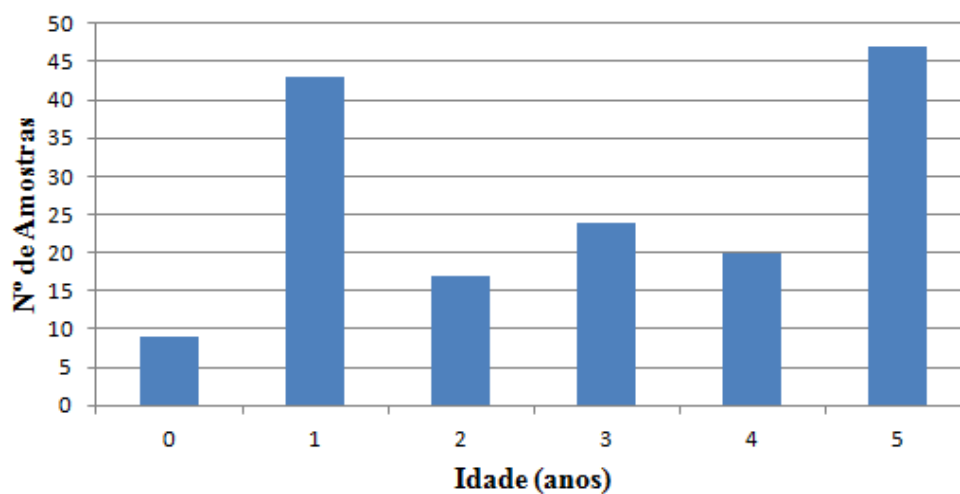
Foram coletadas 160 amostras de fezes de crianças de até cinco anos de idade, provenientes do serviço de atendimento de saúde pública do município de Guarapuava-PR. Com relação ao gênero das crianças de quem foram coletadas as amostras, 48,75% (78) são do gênero masculino e 51,25% (82) são do gênero feminino, como demonstrado na figura 11.

Figura 11 – Distribuição entre gênero feminino e gênero masculino dos pacientes incluídos no estudo.



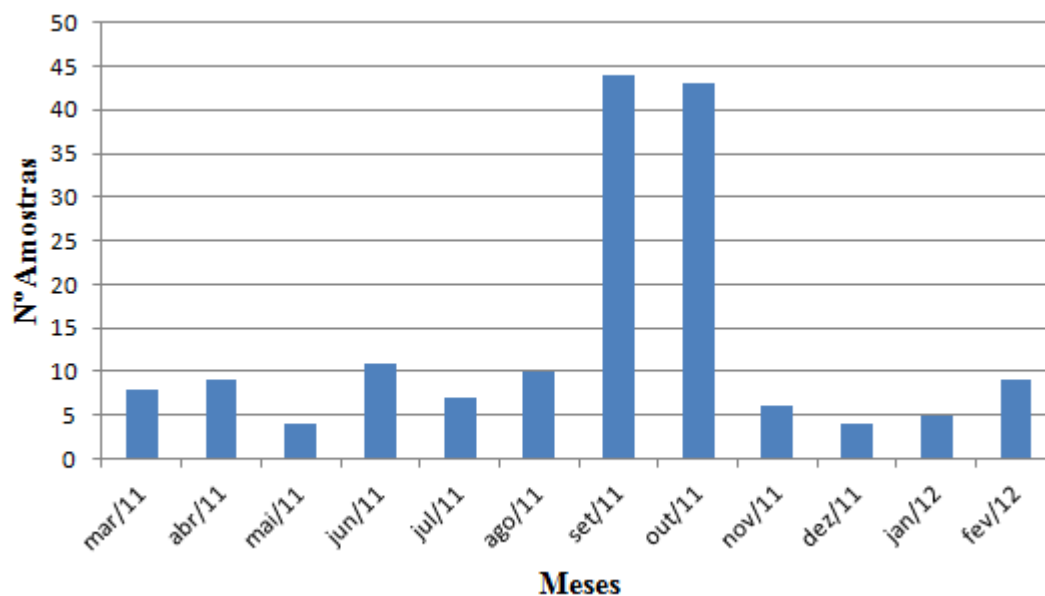
A idade média das crianças foi de 2,82 anos e mediana de 3 anos, variando de quatro meses a cinco anos e 11 meses de idade. A distribuição conforme a faixa etária esta representada na figura 12, onde a distribuição é de zero a cinco anos de idade, sendo que em zero estão as crianças menores que 12 meses de idade, pode-se observar que houve maior número de pacientes com cinco anos e 11 meses e um ano e 11 meses, e um menor número de amostras de crianças menores que doze meses de idade.

Figura 12 - Distribuição dos pacientes incluídos no estudo por faixa etária



Ao todo foram incluídas 146 amostras no ano de 2011 e 14 no ano de 2012. Na figura 13 é demonstrado o número de amostras coletadas em cada mês, os meses com maior número de amostras coletadas foram setembro e outubro de 2011.

Figura 13 - Distribuição mensal das amostras incluídas no estudo no período de 12 meses



4.2 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR)

Para a padronização da RT-PCR foram utilizados controles positivos para rotavírus do grupo A, que foram cedidas pelo professor doutor Celso Granato do Laboratório de Virologia Clínica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). A partir dos protocolos descritos por Gouvea et al. (1990), Gentsch et al. (1992), Das et al. (1994), Gouvea, Santos e Timenetsky (1994) foram realizadas reações de Multiplex-nested-RT-PCR com variações nas concentrações dos componentes a fim de se obter o melhor rendimento da reação.

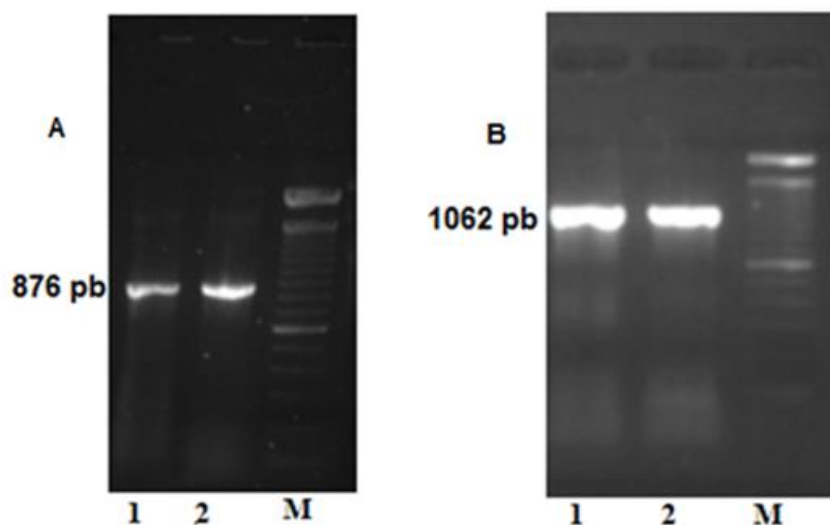
As variações nas concentrações testadas para as enzimas foram 50U, 100U, 150U, 200U e 250U para Transcriptase Reversa, e 0,5U, 1U, 1,5U, 2U e 2,5U para a enzima *Taq* DNA polimerase. Também foram realizadas curvas de concentração do cloreto de magnésio, dNTPs e primers. Para o MgCl₂, as concentrações variaram em 1,5mM, 2mM, 2,5mM, 3mM e 3,5mM; para os dNTPs as variações foram de 0,25mM, 0,5mM, 0,75mM, 1mM e 1,25mM; e para os primers de 0,25µM, 0,5µM, 0,75µM, 1µM e 1,25µM. Além das concentrações foram realizadas curvas na temperatura e tempos para a anelamento dos primers, como descritos na tabela 8. Estas diferentes concentrações e temperaturas foram realizadas para todas as etapas das reações, ou seja, primeira e segunda amplificação dos genes VP4 e VP7.

Tabela 8 - Temperaturas e tempos de anelamento do primers testados nas reações de amplificações dos genes VP4 e VP7.

Reação	Temperatura testadas	Tempo (segundos)
1º round VP7	45,0°C, 47,3°C, 50,0°C, 53,5°C, 56,0°C	20; 30; 40; 60
1º round VP4	40,0°C, 43,6°C, 45,0°C, 49,0°C, 52,6°C	20; 30; 40; 60
2º round VP7	43,6°C, 45,8°C, 48,0°C, 50,0°C, 52,6°C	20; 30; 40; 60
2º round VP4	40,8°C, 42,0°C, 43,0°C, 45,9°C, 47,6°C	20; 30; 40; 60

As diferentes concentrações dos reagentes, temperaturas e tempos de anelamento dos primers foram realizadas em todas as reações de Nested-RT-PCR para os genes VP4 e VP7. Os resultados da otimização para RT-PCR na primeira amplificação dos genes VP4 e VP7 estão exemplificados na figura 14.

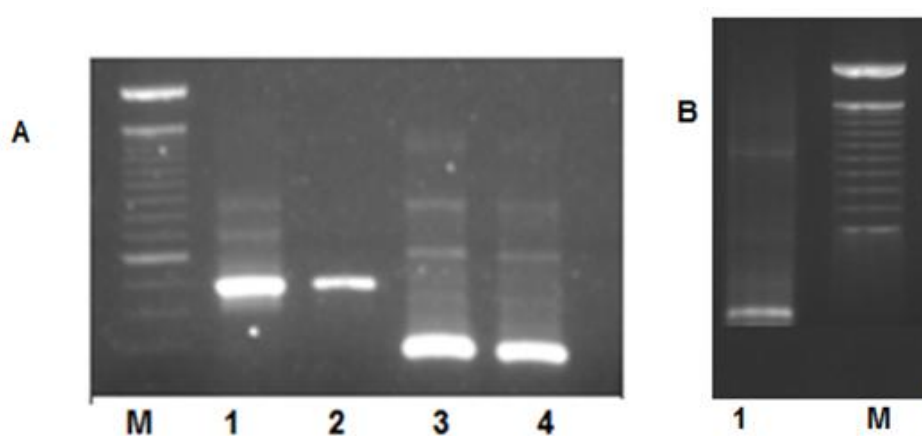
Figura 14 – Perfil eletroforético da primeira amplificação dos genes VP4 e VP7



Perfil eletroforético dos produtos da primeira amplificação dos genes VP4 (A) e VP7 (B) de controle positivos para rotavírus A amplificados por nested RT-PCR: (A) Linha M - Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, EUA); linhas 1 e 2 - fragmento de 876pb do gene P. (B) Linha M - Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA); linhas 1 e 2 - fragmento de 1062pb do gene G.

Para a segunda amplificação, a otimização foi realizada com base na detecção do gene VP7 e caracterização dos genótipos: G1, G2, G3, G4, G5 e G9, e do gene VP4 para os genótipos P[4], P[6], P[8] e P[9]. Na figura 15 esta exemplificada a otimização desta segunda amplificação, onde estão representados os genótipos P[4] e P[6] em A e G1 em B.

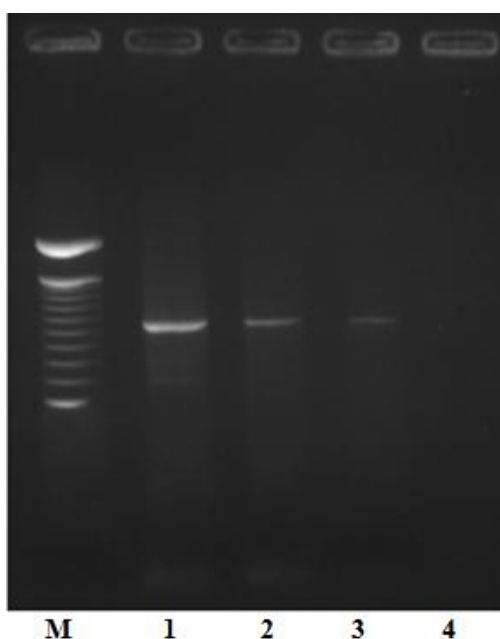
Figura 15 – Produtos da segunda amplificação dos genes VP4 e VP7



(A) Linha M - Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen); linhas 1 e 2 - fragmento de 483pb (genótipo P[4]); linhas 3 e 4 - fragmentos de 267pb (P[6]). (B) Linha M - Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen); linha 1 -fragmento de 158pb (genótipo G1).

Todas as etapas de otimização das reações foram avaliadas levando em consideração a intensidade do brilho da banda esperada, sem o aparecimento de bandas inespecíficas, no perfil eletroforético. Outro parâmetro considerado na otimização da reação foi o limite da capacidade de detecção dos ensaios de amplificação. A fim de avaliar o limite de detecção da reação de Nested-RT-PCR para os genes da VP4 e da VP7, foram realizadas diluições seriadas nas ordens de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} dos controles positivos. Todas as variações descritas na otimização das diferentes etapas das reações foram também avaliadas quanto a capacidade de detecção das diluições controles, sendo que a reação mostrou-se positiva com a diluição de até 10^{-2} , como exemplificado na figura 16 para a reação do gene VP7.

Figura 16 – Limite de detecção da reação de amplificação do gene VP7 aplicados na diluição seriada do controle viral



Linha M - Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, EUA); linha 1 - controle positivo sem diluição, com visualização de banda em 1062pb; linha 2 - Diluição 10^{-1} com visualização banda em 1062pb; Linha 3 - Diluição 10^{-2} , com visualização de banda em 1062pb; linha 4 - Diluição 10^{-3} , não houve aparecimento da banda específica.

4.3 COBERTURA VACINAL

A taxa de vacinação geral dos pacientes incluídos no presente estudo foi de 83,8%, sendo que houve diferenças conforme a idade da criança e ano em que as crianças foram incluídas no estudo, conforme a tabela 9. No ano de 2011, a taxa de vacinação variou de 56,5% a 87,5%, e no ano de 2012 a taxa de vacinação variou de 100% a 66,5%, as menores taxas de vacinação foram encontradas na faixa etária de cinco anos de idade.

Tabela 9 - Crianças vacinadas e não vacinadas, de acordo com a faixa etária do paciente e ano da coleta da amostra no período estudado.

Idade	Coletadas em 2011			Coletadas em 2012		
	Não vacinadas (n)	Vacinadas n	%	Não vacinadas (n)	Vacinadas n	%
0	1	7	87,5	0	1	100,0
1	5	34	87,1	1	3	75,6
2	3	11	78,5	0	3	100
3	3	17	80,9	0	1	100
4	5	14	73,6	0	2	100
5	20	26	56,5	1	2	66,5
Total/média	37	109	77,3	2	12	90,4

n – número de indivíduos; média – percentagem média de vacinados a cada ano.

4.4 DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS NAS AMOSTRAS CLÍNICAS

A RT-PCR para rotavírus foi realizada nas 160 amostras coletadas e não houve detecção de rotavírus em nenhuma das amostras avaliadas.

5 DISCUSSÃO

A infecção por rotavírus acomete principalmente crianças jovens no início da vida, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Melhorias na qualidade da água, alimentação, higiene e saneamento indicaram serem fatores improváveis para interromper a propagação deste vírus. Neste contexto, o desenvolvimento de vacinas eficazes assumiu grande importância para o controle de infecções causadas por rotavírus (GLASS et al., 2013). Assim, a OMS recomendou a vacinação geral em todas as crianças do mundo e enfatizou ser a medida essencial na prevenção contra esta infecção viral. A partir de 2006, duas vacinas foram disponibilizadas para rotavírus humano do grupo A e no ano de 2009 já haviam sido licenciadas em mais de 100 países e incluídas nos programas de imunização de 47. As duas vacinas tem demonstrado alta eficácia (>85%) na prevenção de gastroenterite causada por rotavírus (TATE et al., 2013).

O Brasil foi um dos primeiros países da América Latina a implantar a VORH no PNI, esta medida mostrou-se eficaz para diminuir a incidência da doença grave por rotavírus e mortalidade infantil, sendo atualmente as ações governamentais direcionadas ao aumento da cobertura vacinal em todas as regiões do país (ASSIS et al., 2013).

A realização de estudos que visem acompanhar o perfil das doenças diarreicas na comunidade são de extrema importância para se conhecer o nível de ocorrência, as características da doença em apresentações clínicas variáveis, desde quadros leves até suas complicações, além de tendências temporais. No caso da GA causada por rotavírus este acompanhamento assume um papel mais importante ainda devido à necessidade da vigilância da circulação viral após a implantação da vacina, bem como monitorar continuamente os benefícios gerados por esta medida preventiva (VALENCIA et al., 2003). Nesse sentido, realizamos um estudo de detecção de rotavírus em crianças que receberam ou não a VORH, com até cinco anos de idade na comunidade do município de Guarapuava, através da investigação de amostras recebidas pelo laboratório municipal para investigação de gastroenterite. A maioria dos estudos relacionados com detecção de rotavírus são realizados em ambientes hospitalares e poucos estudos avaliam a circulação deste agente etiológico na comunidade. Assim, estudos em âmbito hospitalar frequentemente relatam uma incidência maior de rotavírus do que os estudos em comunidade, pelo fato que infecção causada por rotavírus é mais grave do que os outros agentes etiológicos, levando na sua maioria das vezes a criança à hospitalização (VIEIRA et al., 2011).

A introdução da prática de imunização de crianças jovens no Brasil também demanda da contínua necessidade de realização de estudos de epidemiologia molecular, pois estas investigações permitem detectar a circulação de variantes genéticas de rotavírus que possam escapar à resposta imunológica, principalmente entre os vacinados. Detecção de rotavírus com genótipo distinto dos constituintes vacinais entre crianças vacinadas, já foi demonstrada em alguns estudos no Brasil (VIEIRA et al., 2011). Sabe-se que a VORH apresenta uma eficácia para outros genótipos não G1P8, porém esta tende a ser menor que a eficácia específica, além do mais diante da diversidade genética do rotavírus e da sua capacidade de recombinação genética a avaliação da eficácia da VORH deve ser constantemente monitorada (ICHIHARA et al., 2014, ARAÚJO et al., 2007). Diante desta situação, em que alguns genótipos possam infectar crianças vacinadas a apresentação clínica desta infecção tende a ser menos grave (SAFADI et al., 2010) e provavelmente não resultaria em hospitalização dos casos, ficando estes casos restritos à comunidade.

Alterações na circulação de rotavírus na comunidade representam o primeiro passo no sentido da elucidação do nível de impacto após a introdução da vacina no Brasil, bem como forma de monitorar alterações genéticas nas cepas virais circulantes. Recentemente, no Brasil, foi evidenciado eventos de rearranjos entre cepas da vacina e cepas circulantes, onde uma cepa G1P8 de uma criança hospitalizada com GA apresentou 100% de homologia com a cepa vacinal (ROSE et al.; 2013).

Neste estudo onde avaliamos a circulação de rotavírus em crianças da comunidade não encontramos pacientes infectados pelo rotavírus. Estudos realizados na comunidade geralmente encontram as menores taxas de infecção por rotavírus, como no estudo realizado por Vieira e colaboradores (2011), na comunidade da cidade de Aracajú, Sergipe, a positividade para rotavírus foi de apenas 4,8%, durante os dois anos que 500 crianças menores de um ano de idade tiveram acompanhamento para casos de GA. Outros dois estudos que não foram conduzidos em âmbito hospitalar demonstraram baixas taxas de infecção para rotavírus, em Goiânia a positividade foi 3,6% (BORGES et al., 2011) e em Juiz de Fora de 5,07% (ASSIS et al., 2013).

Além do fato do presente estudo ser realizado na comunidade, a ausência de rotavírus pode também estar relacionado com taxa de vacinação para rotavírus nas crianças incluídas no estudo. A taxa de vacinação no geral deste estudo foi de 83,8%, variando de 56,5% a 100% conforme a faixa etária. Dados da literatura tem apontado para uma cobertura vacinal geral no país próxima da encontrada neste estudo. Os dados da cobertura vacinal no país são

obtidos através dos registros iniciais em nível municipal dos números de doses administradas da VORH e relacionados com o número de nascimento a cada ano (LANZIERE et al., 2011). Um ano após o início da vacinação para rotavírus a cobertura vacinal já foi de 79,79%, no de 2008 passou para 81,18%, em 2009 foi 85,99%, 2010 foi 83,04% e 2011 com 87,12% (DOMINGUES, TEIXEIRA, 2013). A cobertura no Brasil, difere conforme a região, nas regiões sul e sudeste a cobertura vacinal é superior a 80% e nas regiões norte, nordeste e centro-oeste é inferior a 77% (FLANNER et al., 2013).

Estudos conduzidos no Brasil em municípios com altas coberturas vacinais apontam para uma baixa detecção de rotavírus. Em Goiânia foi realizado um estudo que visou avaliar a eficácia da VORH, sendo coletadas 220 amostras de fezes de crianças menores de cinco anos de idade dos centros de educação materno infantil com cobertura vacinal de 69,5% e a positividade para rotavírus foi de apenas 3,6% (BORGES et al., 2011). Comparando as taxas de infecção por rotavírus entre os períodos pré e pós-vacinais em crianças de faixa etária de 0 a 12 meses, idade hábil para receber o imunizante, demonstrou-se uma redução de 9,3% para 1,8%, e que as maiores reduções de infecção ocorreram de modo geral na faixa etária de 0 a 36 meses, por estar relacionada à maior cobertura vacinal (ASSIS et al., 2013).

Mesmo nas crianças não vacinadas, não encontramos amostras positivas para rotavírus, este fato pode estar relacionado com o benefício indireto da vacinação, reduzindo a transmissão viral. Glass e colaboradores (2013) afirmam um substancial decréscimo no número de hospitalizações devido gastroenterite por rotavírus também em crianças não vacinadas após iniciado o período vacinal, afirmando a possibilidade de estar ocorrendo o fenômeno conhecido com efeito de “vacinação em rebanho”. Em São Paulo, entre 2007 e 2008 ocorreu uma redução global nas hospitalizações entre todas as causas de gastroenterite em crianças <5 anos de idade (59%) e no número de infecções por rotavírus em crianças de 3-5, faixas etárias não elegíveis para receber a vacina nos respectivos anos do estudo (SÁFADI et al., 2010).

Para detectar rotavírus em amostras de fezes uma variedade de técnicas podem ser utilizadas, sendo que as metodologias mais empregadas nas rotinas laboratoriais são imunoenzimáticas, imunocromatográficas e ensaios de aglutinação em látex, que são comercializados em forma de kits e permitem maior simplicidade na execução, porém podem apresentar baixa sensibilidade e especificidade (KAPIKIAN, HOSHINO, CHANOCK, 2001). Em contrapartida, metodologias moleculares podem ser empregadas para detecção de rotavírus com alta sensibilidade e especificidade (DUNG et al., 2013). A

RT-PCR, por exemplo, tornou-se uma técnica amplamente utilizada para tal finalidade através da sua capacidade de detectar pequenas quantidades de cópias de material genético, além de detectar partículas armazenadas por longo período de tempo. Alguns estudos já demonstraram maior capacidade da RT-PCR na detecção de rotavírus em amostras de fezes. A RT-PCR demonstrou ter a capacidade de detectar 20% a mais de infecção por rotavírus do que pelo método imunoenzimático (STOCKMAN et al., 2008), 14% a 44% comparado ao método imunocromatográfico (VANIO et al., 2013; IZZO et al., 2012).

No presente estudo, a RT-PCR foi a metodologia escolhida para garantir uma detecção viral com alta sensibilidade e especificidade. Cabe ressaltar que a RT-PCR mesmo sendo considerada padrão ouro para a detecção e genotipagem de rotavírus A, esta pode apresentar algumas limitações, pois o rotavírus A é susceptível a altas taxas de mutações no genoma até mesmo em regiões conservadas, assim erros de ligação dos primers podem estar ocorrendo, assim necessitando-se de uma avaliação contínua dos especificidade dos primers (MITUI et al., 2012).

Apesar da RT-PCR apresentar bons resultados na maioria dos alvos de RNA, são necessários ajustes nos parâmetros da reação fim de melhorar a especificidade e aumentar o rendimento da metodologia. Segundo Connel (2002) não existe um único protocolo que seja adequado para todas as situações, incluindo laboratório, reagentes e recursos humanos, assim para cada nova experiência é necessário realizar a otimização da reação. A otimização da RT-PCR realizada neste estudo, foi fundamentada em protocolos previamente descritos, visou aumentar o rendimento da reação com base em garantir o maior limite de detecção em cada reação. Pequenas variações em qualquer uma das muitas variáveis da reação de RT-PCR pode ter um efeito pronunciado sobre o perfil do produto da amplificação (CONNEL, 2002). A otimização foi realizada mediante alterações nas concentrações de $MgCl_2$, dNTPs, primers, enzimas tempos e temperaturas de anelamento dos primers e o julgamento do resultado através da visualização da eletroforese dos produtos amplificados, com o aparecimento de bandas na maior diluição e sem produtos inespecíficos.

Apesar da preocupação no presente estudo em garantir o melhor desempenho do teste utilizado, a literatura tem demonstrado que técnicas mais avançadas permitem a detecção de mais amostras quando comparadas a técnica de RT-PCR convencional empregada. Mais recentemente, o desenvolvimento da PCR em tempo real, para detecção e quantificação de rotavírus reduziu o risco de contaminação cruzada, oferecendo um diagnóstico mais rápido e com maior sensibilidade que a PCR convencional, esta metodologia demonstrou a

capacidade de detectar <1000 partículas virais por grama de fezes, podendo amplificar até menos de cinco cópias do gene (NORDGREN, et al., 2010).

Outro aspecto que pode ser considerado com a não detecção de rotavírus, é que após a introdução da VORH outros vírus começaram a destacar-se com causadores de gastroenterite. Nos Estados Unidos, após a implantação da vacina para rotavírus, o norovírus tornou-se a principal causa de gastroenterite em crianças menores que cinco anos (WIKSWO et al., 2013). No Brasil, também já foi evidenciado que o norovírus vem se destacando na etiologia da gastroenterite, após a implantação da VORH no PNI. Em Belém, nos anos de 2008 a 2011, o norovírus teve uma positividade de 35,7% em crianças hospitalizadas com quadro de gastroenterite e o rotavírus representou 21,6% (SIQUEIRA et al., 2013) Além do norovírus, um estudo relatou o aumento na positividade de adenovírus entérico, que passou de uma positividade de 3,3% no período pré-vacinal para 8,2% no período pós-vacinal (MULLER, 2012).

Para o nosso conhecimento este é primeiro estudo sobre a circulação de rotavírus em crianças não hospitalizadas na região do município de Guarapuava-PR. A ausência de positividade nas amostras investigadas pode representar uma limitação do estudo relacionada com a inclusão dos pacientes, que não foi sistemática e ocorreu durante um curto período de tempo. Devido a possibilidade de variação sazonal na circulação do rotavírus seriam recomendados estudos por período mínimo de 3 anos para demonstrarem uma sazonalidade viral mais fidedigna (LEVY, HUBBARD, EISENBERG, 2009). Assim, como a não indicação exclusiva de investigação da etiologia viral nas amostras por parte dos clínicos solicitante do exame podem contribuir para um menor valor preditivo de detecção de rotavírus nesta população. De qualquer forma o presente resultado sugere uma redução na ocorrência de infecção causada pelo rotavírus em crianças com alta taxa de cobertura vacinal, contudo ressalta-se para a necessidade do contínuo monitoramento da circulação e variabilidade do rotavírus circulante na comunidade.

6 CONCLUSÃO

Os ensaios de RT-PCR para detecção e genotipagem de rotavírus do grupo A, foram padronizados e apresentaram bom rendimento, porém não foram detectados casos de infecção por rotavírus em crianças com gastroenterites de até cinco anos de idade e com alta taxa de cobertura vacinal atendidas na rede pública de saúde do município de Guarapuava-PR.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, W.R.; KRAFT, L.M. *Epizootic diarrheas of infant mice: identification of the etiologic agent*. Science. v.141, p.359–360, 1963.

ALMEIDA, M.T.G.; SILVA, R.M.; DONAIRE, L.M.; MOREIRA, L.E.; MARTINEZ, M.B. *Entoropatógenos associados com diarreia aguda em crianças*. Jornal de Pediatria. v.74, n.4, p.291-298, 1998.

AMBROSINI, V.A.; CARRARO, E. *Impacto da vacinação de rotavírus no Brasil*. Revista Medicina Ribeirão Preto. v.45, n.4, p.411-418, 2012.

ANDREASI, M.S.; BATISTA, S.M.; TOZETTI, I.A. *Rotavirus A among hospitalized infants, up to three years of age, with acute gastroenteritis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul*. Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical. v.40, p.411–414, 2007.

ARAUJO, E.C.; CLEMENS, S.A.; OLIVEIRA, C.S.; JUSTINO, M.C.; RUBIO, P.; GABBAY, Y.B.; DA SILVA, V.B.; MASCARENHAS, J.D.; NORONHA, V.L.; CLEMENS, R.; GUSMÃO, R.H.; SANCHEZ, N.; MONTEIRO, T.A.; LINHARES, A.C. *Safety, immunogenicity, and protective efficacy of two doses of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in healthy infants*. Jornal de Pediatria. v.83, n.3, p.217-224, 2007.

ARAUJO, I.T.; FERREIRA, M.S.; FIALHO, A.M.; ASSIS, R.M.; CRUZ, C.M.; ROCHA, M.; LEITE, J.P.G. *Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil*. Journal of Clinical Microbiology. v. 39, n. 5, p. 1999-2001, 2001.

ARNOLD, M.M.; BARRO, M.; PATTON, J.T. *Rotavirus NSP1 Mediates Degradation of Interferon Regulatory Factors through Targeting of the Dimerization Domain*. Journal of Virology. v.87, n.17, p.9813-9821, 2013.

ASSIS, A.S.; VALLE, D.A.; ANTUNES, G.R.; TIBIRIÇA, S.H.; ASSIS, R.M.; LEITE, J.P.; CARVALHO, I.P.; ROSA, SILVA, M.L. *Rotavirus epidemiology before and after vaccine introduction*. Jornal de Pediatria. v.89, n.5, p.470-406, 2013.

BALDACCI, E.R.; CANDEIAS, J.A.N.; BREVIGLIERI, J.C.; GRISI, S.J.E. *Etiologia viral e bacteriana de casos de gastroenterite infantil: uma caracterização clínica*. Revista de Saúde Pública. v.13, p.47-53, 1979.

BERNSTEIN, D.I. *Rotavirus overview*. The Pediatric Infectious Disease Journal. v.28, n.3, p.50-53, 2009.

BINKA, F.N.; ANTO, F.K.; ODURO, A.R.; AWINI, E.A.; NAZZAR, A.K.; ARMAH, G.E.; ASMAH, R.; HALL, A.J.; CUTTS, F.; ALEXANDER, N.; BROWN, D.; GREEN, J.; GRAY, J.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; NAVRONGO. *Incidence and risk factors of paediatric rotavirus diarrhoea in northern Ghana*. Tropical Medicine & International Health. v.8, n.9, p.840-846, 2003.

BISHOP, R.F. *Natural history of human rotavirus infection*. Archives of Virology. v.12, p.119–128, 1996.

BISHOP, R.F.; DAVIDSON, G.P.; HOLMES, I.H.; RUCK, B.J. *Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis*. Lancet. v.1, p.149–151, 1974.

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.302, n.7842, p.1281–1283, 1973.

BLACK, R.E.; COUSENS, S.; JOHNSON, H.L.; LAWN, J.E.; RUDAN, I. BASSANI, D.G.; JHA, P.; CAMPBELL, H.; WALKER, C.F.; CIBULSKIS, R.; EISELE, T.; LIU, L.; MATHERS, C. *Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis*. Lancet, v.375, n.9730, p.1969-1987, 2010.

BLACKHALL, J.; MUÑOZ, M.; FUENTES, A.; MAGNUSSON, G. *Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation*. Journal of Virology. v.72, n.8, p.6398-6405, 1998.

BORGES, A.M.; DIAS, E.; SOUZA, M.; FIACCADORI, F.S.; CARDOSO, D.D. *Monitoring the circulation of rotavirus among children after the introduction of the Rotarix™ vaccine in Goiânia, Brazil*. Memórias Instituto Oswaldo Cruz. v.106, n.4, p.499-501, 2011.

BUGARCIC, A.; TAYLOR, J.A. *Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 is secreted from the apical surfaces of polarized epithelial cells*. Journal of Virology. v.80, n.24, p.1234-1439, 2006.

BUSTIN, S.A. *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. Journal of Molecular Endocrinology. v.25, p.169-193, 2000.

CARTER, M.J. *Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection*. Journal of Applied Microbiology. v.98, p.1354–1380, 2005.

CARVALHO-COSTA, F.A.; ARAÚJO, I.T.; SANTOS, D.E.; ASSIS, R.M.; FIALHO, A.M.; MARTINS, C.M.; BÓIA, M.N.; LEITE, J.P. *Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil*. Emerging Infectious Diseases. v.15, n.1, p.95-97, 2009.

CHIZHIKOV, V.; WAGNER, M.; IVSHINA, A.; HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A.Z.; CHUMAKOV, K. *Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization*. Journal of Clinical Microbiology. v.40, n.7, p.2398-2407, 2002.

CLARK, S.M.; J.R.; ROTH, M.L.; CLARK, B.B.; BARNETT, AND, R.S. SPENDLOVE. *Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement*. Journal of Virology. v.39, p.816-822, 1981.

COLLETTI, J.E.; BROWN, K.M.; SHARIEFF, G.Q.; BARATA, I.A.; ISHIMINE. *The management of children with gastroenteritis and dehydration in the emergency department*. The Journal of Emergency Medicine. v.38, n.5, p.686–698, 2010.

CONNEL JOE, O. *RT-PCR Protocols*. v.193. New Jersey: Humana Press Totowa, 2002.

CONSTENLA, D.O.; LINHARES, A.C.; RHEINGANS, R.D.; ANTIL, L.R.; WALDMAN, E.A.; DA SILVA, L.J. *Economic impact of a rotavirus vaccine in Brazil* Journal of Health, Population, and Nutrition. v.26, n.4, p.388-396, 2008.

CORTESE, M.M.; PARASHAR, U.D. *Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)*. MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control. v.6, n.58 (RR-2), p.1-25, 2009.

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*. Journal of Clinical Microbiology. v.32, n.7, p.1820-1822, 1994.

DAS, M.; DUNN, S.J.; WOODE, G.N.; GREENBERG, H.B.; RAO, C.D. *Both surface proteins (VP4 and VP7) of an asymptomatic neonatal rotavirus strain (I321) have high*

levels of sequence identity with the homologous proteins of a serotype 10 bovine rotavirus. Virology. v.194, n.1, p.374-379, 1993.

DAVIDSON, G.P.; BISHOP, R.F.; TOWNLEY, R.R.; HOLMES, I.H. *Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children.* Lancet. v.1, n.7901, p. 242-246, 1975.

DENNEHY PH. *Rotavirus vaccines: an overview.* Clinical Microbiology Reviews. v.21, n.1, p.198-208, 2008.

DENNEHY, P.H.; GAUNTLETT, D.R.; SPANGENBERGER, S.E. *Choice of reference assay for the detection of rotavirus in fecal specimens: electron microscopy versus enzyme immunoassay.* Journal of Clinical Microbiology. v.28, n.6, p.1280-1283, 1990.

DE PALMA, O.; CRUZ, L.; RAMOS, H.; BAIREZ, A.; VILLATORO, N.; PASTOR, D.; OLIVEIRA, L.H.; KERIN, T.; BOWEN, M.; GENTSCH, J.; ESPOSITO, D.H.; PARASHAR, U.; TATE, J.; PATEL, M. *Effectiveness of rotavirus vaccination against childhood diarrhoea in El Salvador: case-control study.* BMJ. v.15, n.340, p.1-7, 2010.

DOMINGUES, C.M.; TEIXEIRA, A.M.S. *Vaccination coverage and impact on vaccine-preventable diseases in Brazil between 1982 and 2012: National Immunization Program progress and challenges.* Epidemiologia e Serviços da Saúde. v.22, n.1, p.9-27, 2013.

DUNG, T.T.; PHAT, V.V.; NGA, T.V.; MY, P.V.; DUY, P.T.; CAMPBELL, J.I.; THUY, C.T.; HOANG, N.V.; VAN, MINH, P.; LE, PHUC, H.; TUYET, P.T.; VINH, H.; KIEN, D.T.; HUY, HLE, A.; VINH, N.T.; NGA, T.T.; HAU, N.T.; CHINH, N.T.; THUONG, T.C.; TUAN, H.M.; SIMMONS, C.; FARRAR, J.J.; BAKER, S. *The validation and utility of a quantitative one-step multiplex RT real-time PCR targeting rotavirus A and norovirus.* Journal of Virological Methods. v.187, n.1, p.138-143, 2013.

DUSETTY, P.; VELÁZQUEZ, F.R.; GUTIÉRREZ-ESCOLANO, A.L.; LUDERT, J.E. *Evaluation of the second generation of a commercial latex agglutination test for the detection of rotavirus antigens in fecal samples.* Journal of Clinical Virology. v.57, n.1, p.88-90, 2013.

ESTES, M.K. *Rotaviruses and their replication.* In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E. Fields Virology. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.1426-1443.

ESTES, M.K.; COHEN, J. *Rotavirus gene structure and function*. Microbiological Reviews. v.53, n.4, p.410-449, 1989.

FABBRETTI, E.; AFRIKANOVA, I.; VASCOTTO, F.; BURRONE, O.R. *Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo*. The Journal of General Virology. v.80, n.2, p.333-339, 1999.

FLANNER, Y.B.; SAMAD, S.; D.E.; MORAES, J.C.; TATE, J.E.; DANOVARO-HOLLIDAY, M.C.; DE OLIVEIRA, L.H.; RAINEY, J.J. *Uptake of oral rotavirus vaccine and timeliness of routine immunization in Brazil's National Immunization Program*. Vaccine. v.31, n.11, p.1523-1528, 2013.

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*. Journal of Clinical Pathology. v.27, n.8, p.603-608, 1974.

GENTSCH, J.; GRAY, J.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; KLENA, J.; KIRKWOOD, C.; ARMAH, G. *Manual of rotavirus detection and characterization methods*. World Health Organization, Department of Immunization, Vaccines and Biologicals, 2009.

GENTSCH, J.R.; GLASS, R.I.; WOODS, P.; GOUVEA, V.; GORZIGLIA, M.; FLORES, J.; DAS, B.K.; BHAN, M.K. *Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction*. Journal of Clinical Microbiology. v.30, n.6, p.1365-1373, 1992.

GILGER, M.A.; MATSON, D.O.; CONNER, M.E.; ROSENBLATT, H.M.; FINEGOLD, M.J.; ESTES, M.K. *Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency*. The Journal of Pediatrics. v.120, p.912-917, 1992.

GLASS, R.I.; BRESEE, J.S.; TURCIOS, R.; FISCHER, T.K.; PARASHAR, U.D.; STEELE, A.D. *Rotavirus vaccines: targeting the developing world*. Journal of Infectious Disease. v.1, n.192, p.160-166, 2005.

GLASS, R.I.; PARASHAR, U.; PATEL, M.; GENTSCH, J.; JIANG, B. *Rotavirus vaccines: Successes and challenges*. The Journal of Infection. v.68, n1, p.9-18, 2013.

GOMES, T.A.; RASSI, V.; MACDONALD, K.L.; RAMOS, S.R.; TRABULSI, L.R.; VIERIRA, M.A.; GUTH, B.E.; CANDEIAS, J.A.; IVEY, C.; TOLEDO, M.R. *Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil*. Journal of infectious diseases. v.164, n.2, p.331-337, 1991.

GONZALEZ, R.A.; TORRES-VEJA, M.A.; LOPEZ, S.; ARIAS, C.F. *In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins*. Archives of Virology. v.143, p.981–996, 1998.

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*. Journal of Clinical Microbiology. v.28, n.2, p.276-282, 1990.

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M.D.O.C. *Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR*. Journal of Clinical Microbiology. v.32, n.5, p.1338-1340, 1994.

GOUVEA, V.; SANTOS, N. *Rotavirus serotype G5: an emerging cause of epidemic childhood diarrhea*. Vaccine. v.17, n.12, p.1291-1292, 1999.

GUERRANT, R.L.; VAN, G. T.; STEINER, T.S.; THIELMAN, N.M.; SLUTSKER, L. TAUXE R.V.; HENNESSY, T. GRIFFIN, P.M.; DUPONT, H.; SACK, R.B.; TARR, P. NEILL, M.; NACHAMKIN, I.; RELLER, L.B. OSTERHOLM, M.T.; BENNISH, M.L. PICKERING, L.K. *Practice guidelines for the management of infectious diarrhoea*. Clinical Infectious Diseases. v.32, n.3, p.331–351, 2001.

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.1970-1975, 2009.

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*. Journal Infectious Diseases. v. 201, n.3, p.363-369, 2010.

GURGEL, R.Q.; CUNLIFFE, N.A.; NAKAGOMI, O.; CUEVAS, L.E. *Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: a review*. Journal of Clinical Virology. v.43, n.1, p.1-8, 2008.

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*. Emergence Infectious Disease. v.13, n.10, p.1571-1573, 2007.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. *Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels*. Journal of Clinical Microbiology. v.16, n.3, p.473-477, 1982.

HU, L.; CRAWFORD, S.E.; HYSER, J.M.; ESTES, M.K.; PRASAD, B.V. *Rotavirus non-structural proteins: structure and function*. Current Opinion in Virology. v.2, n.4, p.380-388, 2012.

ICHIHARA, M.Y.; RODRIGUES, L.C.; TELES, SANTOS, C.A.; TEIXEIRA, M.D.; JESUS, S.R.; ALVIM, MATOS, S.M.; GAGLIARDI, LEITE, J.P.; BARRETO, M.L. *Effectiveness of rotavirus vaccine against hospitalized rotavirus diarrhea: A case-control study*. Vaccine. S0264-410X(14)00008-5. doi: 10.1016/. 2014.

IPARDES - INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. Disponível em: <http://www.ipardes.gov.br/perfil_municipal/MontaPerfil.php?Municipio=85000&btOk=ok>. Acessado em 12 de out de 2013.

IZZO, M.M.; KIRKLAND, P.D.; GU, X.; LELE, Y.; GUNN, A.A.; HOUSE, J.K. *Comparison of three diagnostic techniques for detection of rotavirus and coronavirus in calf faeces in Australia*. The Australian Veterinary Journal. v.90, n.4, p.122-129, 2012.

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

JUSTINO, M.C.; LINHARES, A.C.; LANZIERI, T.M.; MIRANDA, Y.; MASCARENHAS, J.D.; ABREU, E.; GUERRA, S.F.; OLIVEIRA, A.S.; SILVA, V.B.; SANCHEZ, N.; MEYER, SHAFI, F.; ORTEGA-BARRIA, E.; SORIANO-GABARRÓ, M.; COLINDRES, R.E. *Effectiveness of the monovalent G1P[8] human rotavirus vaccine against hospitalization for severe G2P[4] rotavirus gastroenteritis in Belém, Brazil*. The Pediatric Infectious Diseases Journal. v.30, n.5, p.396-401, 2011.

KAPIKIAN AZ, CLINE WL, MEBUS CA, WYATT RG, KALICA AR, JAMES HD JR, VANKIRK D, CHANOCK RM. *New complement-fixation test for the human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. Nebraska calf diarrhea virus used as antigen*. Lancet. v.10, n.1, p.1056-1061, 1975.

KAPIKIAN, A.Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R.M. *Rotaviruses and their replication*. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E. Fields Virology. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.1455-1478.

KAPIKIAN, A.Z.; KIM, H.W.; WYATT, R.G.; CLINE, W.L.; PARROTT, R.H. CHANOCK, R.M.; ARROBIO, J.O.; BRANDT, C.D.; RODRIGUEZ, W.J.; KALICA, A.R.; VAN, KIRK, D.H. *Recent advances in the a etiology of viral gastroenteritis*. Ciba Foundation Symposium. v.42, p.273-309, 1976.

KAPIKIAN, A.Z.; KIM, H.W.; WYATT, R.G.; RODRIGUEZ, W.J.; ROSS, S.; CLINE 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 Infectious Nonbacterial Gastroenteritis*. Journal of Virology. v.10, n.5, p.1075-1081, 1972.

KAPIKIAN, A.Z.; WYATT, R.G.; LEVINE, M.M.; YOLKEN, R.H.; VANKIRK, D.H.; DOLIN, R.; GREENBERG, H.B.; CHANOCK, R.M. *Oral administration of human rotavirus to volunteers: induction of illness and correlates of resistance*. The Journal of Infectious Diseases. v.147, n.1, p.95-106, 1983.

LANATA, C.F.; FISCHER-WALKER, C.L.; OLASCOAGA, A.C.; TORRES, C.X.; ARYEE, M.J.; BLACK, R.E. *Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review*. PLoS One. v.4, n.8, p.727-788, 2013.

LANZIERI, T.M. LINHARES, A.C.; COSTA, I.; KOLHE, D.A.; CUNHA, M.H.; ORTEGA-BARRIA, E.; COLINDRES, R.E. *Impact of rotavirus vaccination on childhood deaths from diarrhea in Brazil*. International Journal Infectious Disease. v.15, n.3, p.206-210, 2011.

LAWTON, J.A.; ZENG, C.Q.; MUKHERJEE, S.K.; COHEN, J.; ESTES, M.K.; PRASAD, B.V. *Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer*. Journal of Virology. v.71, n.10, p.7353-7360, 1997.

LEITE, J.P.G.; CARVALHO, C.; LINHARES, A.C. *Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: A review*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v.103, n.8, p.745-753, 2008.

LEVY, K.; HUBBARD, A.E.; EISENBERG, J.N. *Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis*. International Journal Epidemiology. v.38, n.6, p.1487-1496, 2009.

LINHARES, A.C.; PINHEIRO, F.P.; SCHMETZ, C.; MÜLLER, G.; PETERS, D. *Duovirus (Rotavirus) in Belém, State of Para, Brazil*. Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo. v.19, n.4, p.278-279, 1977.

LINHARES, A.C.; STUPKA, J.A.; CIAPPONI, A.; BARDACH, A.E.; GLUJOVSKY, D.; ARUJ, P.K.; MAZZONI, A.; RODRIGUEZ, J.A.; REARTE, A.; LANZIERI, T.M.; ORTEGA-BARRIA, E.; COLINDRES, R. *Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis*. *Reviews in Medical Virology*. v.21, n.2, 89-109, 2011.

LIU, L.; JOHNSON, H.L.; COUSENS, S.; PERIN, J.; SCOTT, S.; LAWN, J.E.; RUDAN, I.; CAMPBELL, H.; CIBULSKIS, R.; L.I.M.; MATHERS, C.; BLACK, R.E. *Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000*. *Lancet*. v.9, n.379, p.2151-2161, 2012.

LOVMAR, L.; FOCK, C.; ESPINOZA, F.; BUCARDO, F.; SYVÄNEN, A.C.; BONDESON, K. *Microarrays for genotyping human group a rotavirus by multiplex capture and type-specific primer extension*. *Journal of Clinical Microbiology*. v.41, n.11, p.5153-5158, 2003.

LUCHS A1, CILLI A2, MORILLO SG2, DE CASSIA COMPAGNOLI CARMONA R2, DO CARMO SAMPAIO TAVARES TIMENETSKY M2. *Rotavirus in adults, Brazil, 2004-2011: G2P[4] dominance and potential impact on vaccination*. *Brazil Journal Infectious Diseases*. v. 18, n.1, p.53-59, 2014.

LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. *Pathogenesis of rotavirus diarrhea*. *Microbes and Infection*. v.3, n.13, p.1145-1156, 2001.

LUZ, C.R.; MASCARENHAS, J.D.; GABBAY, Y.B.; MOTTA, A.R.; LIMA, T.V.; SOARES, L.A.S.; LINHARES, A.C. *Rotavirus serotypes and electropherotypes identified among hospitalised children in São Luís, Maranhão, Brazil*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v.47, n.5, p.287-293, 2005.

MADHI, S.A.; CUNLIFFE, N.A.; STEELE, D.; WITTE, D.; KIRSTEN, M.; LOUW, C.; NGWIRA, B.; VICTOR, J.C.; GILLARD, P.H.; CHEUVART, B.B.; HAN, H.H.; NEUZIL, K.M. *Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants*. *The New England Journal of Medicine*. v.362, n.4, p.289-298, 2010.

MALIK, Y.P.; CHANDRASHEKAR, K.M.; SHARMA, K.; PRASAD, M.; PRASAD, G. *Evidence for Occurrence of Human group B rotavirus in Central India Based on Characterization of NSP2 Gene*. *Indian Journal of Virology*. v.22, n.2, p.98-103, 2011.

MASCARENHAS, J.D.P.; PAIVA, F.L.; BARARDI, C.R.M.; GABBAY, Y.B.; SIMÕES, C.O.; LINHARES, A.C. *Rotavirus G and P types in children from Belém, northern Brazil*,

as determined by RT-PCR: occurrence of mixed P type infections. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*. v.16, n. 1, p.8-14, 1998.

MATTHEWS, R.E. *The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in The Hague, September 1978*. *Intervirology*. v.11, n.3, p.133-135, 1979.

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*. *Journal of Virology*. v.82, p.3204–3219, 2008.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; MCDONALD, S.M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; BRISTER, J.R.; BUESA, J.; ESONA, M.D.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; JOHNE, R.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.; NAKAGOMI, O.; PARREÑO, V.; RAHMAN, M.; RUGGERI, F.M.; A.I.F.; L.J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; PATTON, J.T.; DESSELBERGER, U.; VAN-RANST, M. *Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG)*. *Archives of Virology*. v.156, n.8, p.1397-1413, 2011.

MATTHIJNSSENS, J.; RAHMAN, M.; CIARLET, M.; ZELLER, M.; HEYLEN, E.; NAKAGOMI, T.; UCHIDA, R.; HASSAN, Z.; AZIM, T.; NAKAGOMI, O.; VAN RANST, M. *Reassortment of human rotavirus gene segments into G11 rotavirus strains*. *Emerging Infectious Diseases*. v.16, n.4, p.625-630, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Calendário Nacional de Vacinação. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=32040&janela=1>. Acessado em 13 out. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/vigilanciadda.pdf>>. Acessado em 12 out. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância epidemiológica das doenças diarreicas. Tabela número de casos de doença diarreica do ano de 200 a 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_dda_16_04_2012.pdf>. Acessado em 12 nov. 2013.

MITUI, M.T., CHANDRASENA, T.N.; CHAN, P.K.; RAJINDRAJITH S, NELSON EA, LEUNG TF, NISHIZONO A, AHMED K. *Inaccurate identification of rotavirus genotype*

G9 as genotype G3 strains due to primer mismatch. Virology Journal. v.9, n.144, p.2-5, 2012.

MOMENZADEH, A.; MODARRES, S.; FARAJI A.; MOTAMEDI M.; SOHRABI A.; MODARRESS.; AZARNOUSH, L.; MIRSHAHABII H. *Comparison of Enzyme Immunoassay, Immunochemistry, and RNA-Polyacrylamide- Gel Electrophoresis for Diagnosis of Rotavirus Infection in Children with Acute Gastroenteritis.* The Iranian Journal of Medical Sciences. v.33, n.3, p.173-176, 2008.

MOORE, S.R. *Update on prolonged and persistent diarrhoea in children.* Current Opinion in Gastroenterology. v.27, n.1, p.19-23, 2011.

MORILLO, S.G.; LUCHS, A.; CILLI, A.; COSTA, F.F.; CARMONA, R.D.E.C.; TIMENETSKY, M.D.O.C. *Characterization of rotavirus strains from day care centers: pre- and post-rotavirus vaccine era.* Jornal de Pediatria. v.86, n.2, p.155-158, 2010.

MULLER, E.C.A. *Prevalência de adenovírus em crianças com gastroenterite aguda grave antes e após a introdução da vacina contra rotavírus no Brasil.* 2011. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Doenças Tropicais)–Núcleo de Medicina Tropical, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ.

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. KHOURY A.; IKEDO F.; RÁCZ M.L. *Rotavirus gastroenteritis in children in 4 regions in Brazil: a hospital-based surveillance study.* Journal Infectious Disease. v.1, n.1, p.106-113, 2009.

NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T. *Interspecies transmission of rotaviruses studied from the perspective of genogroup.* Microbiology and Immunology. v.37, n.5, p.37-48, 1993.

NORDGREN, J.; BUCARDO, F.; SVENSSON, L.; LINDGREN, P.E. *Novel light-upon-extension real-time PCR assay for simultaneous detection, quantification, and genogrouping of group A rotavirus.* Journal of Clinical Microbiology. v.48, n.5, p.1859-1865, 2010.

NOZAWA, C.M.; KERNTOPF, G.F, CZERNISZ, E.D.A.S.; ALBUQUERQUE, D.; ROMANIN, P.; FREITAS, J.F.; SANTOS, N.; BENATI, F.J.; PIETRUCHINSKI, E. LINHARES, R.E. *Detection and characterization of human rotavirus in hospitalized patients in the cities of Ponta Grossa, Londrina and Assai - PR, Brazil.* The Brazilian Journal of Infectious Diseases. v.14, n.6, p.553-557, 2010.

ODIMAYO, M.S.; OLANREWAJU, W.I.; OMILABU, S.A.; ADEGBORO, B. *Prevalence of rotavirus-induced diarrhea among children under 5 years in Ilorin, Nigeria*. Journal of Tropical Pediatrics. v.54, n.5, p.343-346, 2008.

PARASHAR, U.D.; BRESEE, J.S.; GENTSCH, J.R.; GLASS, R.I. *Rotavirus*. Emerging Infectious Diseases. v.4, p.561-570, 1998.

PARASHAR, U.D.; BURTON, A.; LANATA, C.; BOSCHI-PINTO, C.; SHIBUYA, K.; STEELE, D.; BIRMINGHAM, M.; GLASS, R.I. *Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004*. Journal Infectious Disease. v.1, n.200, n.1, p.9-15, 2009.

PARASHAR, U.D.; GIBSON, C.J.; BRESEE, J.S.; GLASS, R.I. *Rotavirus and severe childhood diarrhea*. Emerging Infectious Diseases. v.12, n.2, p.304-306, 2006.

PATEL, M.M.; PATZI, M.; PASTOR, D.; NINA, A.; ROCA, Y.; ALVAREZ, L.; INIGUEZ, V.; RIVERA, R.; TAM, K.I.; QUAYE, O.; BOWEN, M.; PARASHAR, U.; OLIVEIRA, L.H. *Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine in Bolivia: case-control study*. BMJ. v.19, n.346, p.1-11, 2013.

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*. Current Topics in Microbiology and Immunology. v.309, p.169-187, 2006.

PEREIRA, A.L.; FERREIRAI, TURCHETTOII. C.G.; NOGUEIRAI M.B.; VIDALII, L.R.; CRUZIII, R.C.; DEBURIV, M.C.; ALMEIDA S.V; RABONI, S.M. *Caracterização molecular dos genótipos do rotavírus em pacientes pediátricos imunossuprimidos e não imunossuprimidos*. Jornal de Pediatria. v.89, n.3, 2013.

PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; SUTMOLLER, F.; LEITA, J. P. G.; FARIAS, U. 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*. Memórias Instituto Oswaldo Cruz. v.78, p.483-490, 1983.

PEREIRA, H.G.; LEITE, J.P.; AZEREDO, R.S.; DE FARIAS, V.; SUTMOLLER, F. *An atypical rotavirus detected in a child with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil*. Memorias Instituto Oswaldo Cruz. v.78, n.3, p.245-250, 1983.

PEREIRA, H.G.; LINHARES, A.C.; CANDEIAS, J.A.N.; GLASS, R.I. *National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil*. Bulletin of the Pan American Health Organization, Washington. v.27, n.27, p.224-233, 1993.

PEREIRA, L.A.; RABONI, S.M.; NOGUEIRA, M.B.; VIDAL, L.R. ALMEIDA, S.M. DEBUR, M.C.; CRUZ, C. *Rotavirus infection in a tertiary hospital: laboratory diagnosis and impact of immunization on pediatric hospitalization. Brazilian Journal of Infectious Diseases.* v.15, n.3, p.215-219, 2011.

PIRON, M.; VENDE, P.; COHEN, J., PONCET, D. *Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F.* The EMBO Journal. v.17, n.19, p.5811-5821, 1998.

RABONI, S.M.; NOGUEIRA, M.B.; HAKIM, V.M.; TORRECILHA, V.T.; LERNER, H.; TSUCHIYA, L.R. *Comparison of latex agglutination with enzyme immunoassay for detection of rotavirus in fecal specimens.* American Journal of Clinical Pathology. v.117, n.3, p.392-394, 2002.

RAINSFORD, E.W.; MCCRAE, M.A. *Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11.* Virus Research. v.130, n.1-2, p.193-201, 2007.

RAMIG, R. F. *Genetics of the rotaviruses.* The Annual Review of Microbiology. v.51, p.225-55, 1997.

RAMIG, R. F. *Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection.* Journal of Virology. v.78, p.10213-10220, 2004.

ROSE, T.L.; MARQUES, D.A. SILVA, M.F.; GOMÉZ, M.M.; RESQUE, H.R.; ICHIHARA, M.Y.; VOLOTÃO, E.D.E.M.; LEITE, J.P. *Evidence of Vaccine-related Reassortment of Rotavirus, Brazil, 2008-2010.* Emerging Infectious Disease. v.19, n.11, 2013.

SÁFADI, M.A.; BEREZIN, E.N.; MUNFORD, V.; ALMEIDA, F.J.; D.E.; MORAES, J.C.; PINHEIRO, C.F.; RACZ, M.L. *Hospital-based surveillance to evaluate the impact of rotavirus vaccination in São Paulo, Brazil.* The Pediatric Infectious Disease Journal. v.29, n.11, p.1019-1022, 2010.

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

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ. Série históricas de coberturas vacinais. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/-conteudo.php?conteudo=534>>. Acessado em: 11 de out. de 2013.

SIQUEIRA, J.A.; LINHARES, A.D.A.C.; GONÇALVES, MDOS, S.; DE CARVALHO, T.C.; JUSTINO, M.C.; MASCARENHAS, J.D.; GABBAY, Y.B. *Group A rotavirus and norovirus display sharply distinct seasonal profiles in Belém, northern Brazil*. Memórias Instituto Oswaldo Cruz. v.108, n.5, n.661-664, 2013.

STAAT, M.A.; AZIMI, P.H.; BERKE, T.; ROBERTS, N.; BERNSTEIN, D.I.; WARD, R.L.; PICKERING, L.K.; MATSON, D.O. *Clinical presentations of rotavirus infection among hospitalized children*. The Pediatric Infectious Disease Journal. v.21, n.3, p.221-227, 2002.

STOCKMAN, L.J.; STAAT, M.A.; HOLLOWAY, M.; BERNSTEIN, D.I.; KERIN, T.; HULL, J.; YEE, E.; GENTSCH, J.; PARASHAR, U.D. *Optimum diagnostic assay and clinical specimen for routine rotavirus surveillance*. Journal of Clinical Microbiology. v.46, n.5, p.1842-1843, 2008.

STEWIEN, K.E.; CUNHA, L.C.; ALVIM, A.D.E.C.; ALVIM, M.A.; BRANDÃO, A.A.; NEIVA, M.N. *Rotavirus associated diarrhoea during infancy in the city of S. Luís (MA), Brazil: a two-year longitudinal study*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. v.33, n.6, p.459-464, 1991.

SVENSSON, L.H.; SHESHBERADARAN, H.; VESIKARI, T.; NORRBY, E.; WADELL, G. *Immune response to rotavirus polypeptides after vaccination with heterologous rotavirus vaccines (RIT 4237, RRV-1)*. The Journal of general virology. v.68, p.1993-1999, 1987.

SVENSSON, L.H.; SHESHBERADARAN, S.; VENE, E.; NORRBY, M.; GRANDEIN, AND, G.; WADELL. *Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections*. Journal of General Virology. v.68, p.643-651, 1987.

TATE, J.E.; BURTON, A.H.; BOSCHI-PINTO, C.; STEELE, A.D.; DUQUE, J.; PARASHAR, U.D.; C.D.C. *2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis*. The Lancet Infectious Diseases. v.12, n.2, p.136-141, 2012.

TATE, J.E.; CURNS, A.T.; CORTESE, M.M.; WEINTRAUB, E.S.; HAMBIDGE, S.; ZANGWILL, K.M.; PATEL, M.M.; BAGGS, J.M.; PARASHAR, U.D. *Burden of acute gastroenteritis hospitalizations and emergency department visits in US children that is*

potentially preventable by rotavirus vaccination: a probe study using the now-withdrawn rotashield vaccine. Pediatrics. v.123, n.3, p.744-749, 2009.

TATE, J.E.; MIJATOVIC-RUSTEMPASIC, S.; TAM, K.I.; LYDE, F.C.; PAYNE, D.C.; SZILAGYI, P.; EDWARDS, K.; STAAT, M.A.; WEINBERG, G.A.; HALL, C.B.; CHAPPELL, J.; MCNEAL, M.; GENTSCH, J.R.; BOWEN, M.D.; PARASHAR, U.D. *Comparison of 2 assays for diagnosing rotavirus and evaluating vaccine effectiveness in children with gastroenteritis.* Emerging Infectious Disease. v.19, n.8, p. 1245-1252, 2013.

VAINIO, K.; NORDBØ, S.A.; NJØLSTAD, G.; STØRVOLD, G.; DØLLNER, H.; MIDGAARD, C.; BOSSE, F.J.; ROGNLIEN, A.G.; ROJAHN A, WATHNE, K.O.; FLEM, E. *Detection and characterization of group A rotaviruses in children hospitalized with acute gastroenteritis in Norway, 2006-2008.* Journal of Medical Virology. v.81, n.10, p.1839-1844, 2009.

VALENCIA, R.; ROMAN, E.; GARCIA-LEON, F. J.; GUILLÉN, J. *Sistemas de Alerta: Una Prioridad en Vigilancia Epidemiológica.* Gaceta Sanitaria. v.1, n.6, p.520-522, 2003.

VESIKARI, T. *Rotavirus vaccination: a concise review.* Clinical microbiology and infection. v. 18, n.5, p.57-63, 2012.

VESIKARI, T.; KARVONEN, A.; PRYMULA, R, SCHUSTER, V.; TEJEDOR, J.C.; COHEN, R.; MEURICE, F.; HAN, H.H.; DAMASO, S.; BOUCKENOOGHE, A. *Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, double-blind controlled study.* Lancet. v. 370, n. 9601, p. 1758-1763, 2007.

VESIKARI, T.; CLARK, H.F.; OFFIT, P.A.; DALLAS, M.J.; DISTEFANO, D.J.; GOVEIA, M.G.; WARD, R.L.; SCHÖDEL, F.; KARVONEN, A.; DRUMMOND, J.E.; DINUBILE, M.J.; HEATON, P.M. *Effects of the potency and composition of the multivalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine on efficacy, safety and immunogenicity in healthy infants.* Vaccine. v.29, n.24, p.4821-4829, 2006.

VIEIRA, S.C.; GURGEL, R.Q.; KIRBY, A.; BARRETO, I.P.; SOUZA, L.D.; OLIVEIRA, O.C.; CORREIA, J.D.E.B.; DOVE, W.; CUNLIFFE, N.A.; CUEVAS, L.E. *Acute diarrhoea in a community cohort of children who received an oral rotavirus vaccine in Northeast Brazil.* Memórias Instituto Oswaldo Cruz. v.106, n.3, p.330-334, 2011.

VIZZI, E.; CALVIÑO, E.; GONZÁLEZ, R.; PÉREZ-SCHAEL, I.; CIARLET, M.; KANG, G; ESTES, M.K; LIPRANDI, F.; LUDERT, J.E. *Evaluation of serum antibody responses against the rotavirus nonstructural protein NSP4 in children after Rhesus rotavirus*

tetravalent vaccination or natural infection. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. v.12, p.1157-1163, 2005.

VRANJAC, A. *Vacina contra rotavírus*. Revista de Saúde Pública. v.40, n.2, p.355-358, 2006.

WALKER, C.L.; ARYEE, M.J.; BOSCHI-PINTO, C.; BLACK, R.E. *Estimating diarrhea mortality among young children in low and middle income countries*. PLoS One. v.7, n.1, e29151, 2012.

WANG, J.; JIANG X.; MADORE H.P.; GRAY J.; DESSELBERGER U.; ANDO T.; SETO, Y.; OISHI, I.; LEW, J.F.; GREEN, K.Y. *Sequence diversity of small, round-structured viruses in the Norwalk virus group*. Journal of Virology. v.68, n.9, p.5982-5990, 1994.

WHO (World Health Organization). *The treatment of Diarrhoea: A manual for physicians and other senior health workers*. 4th Revision of document WHO/CDD/SER/80.2; 2008. Disponível em: < <http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241593180.pdf>> Acessado em: 28 ago de 2013.

WIKSWO, M.E.; DESAI, R.; EDWARDS, K.M.; STAAT, M.A.; SZILAGYI, P.G.; WEINBERG, G.A.; CURNS, A.T.; LOPMAN, B.; VINJÉ, J.; PARASHAR, U.D.; PAYNE, D.C.; HALL, A.J. *Clinical profile of children with norovirus disease in rotavirus vaccine era*. Emerging Infectious Diseases. v.19, n.10, p.1691-1693, 2013.

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*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. v.20, n.10, p.741-743, 2001.

WILHELMI, I.; ROMAN, E.; SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. *Viruses causing gastroenteritis*. Clinical microbiology and infection. v.9, n.4, p.247-262, 2003

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Meeting of the immunization Strategic Advisory Group of Experts, April 2009 – conclusions and recommendations*. WER, 84 (23) p. 213–236, 2009.

YOW, M.D.; MELNICK, J.L.; BLATTNER, R.J.; STEPHENSON, W.B.; ROBINSON, N.M.; BURKHARDT, M.A. *The association of viruses and bacteria with infantile diarrhea*. American Journal of Epidemiology. v.92, n.1, p.33-39, 1970.

ZUCKERMAN, J.; BANATVALA, JE.; PATTISON, J.R.; GRIFFITHS P.D.; SCHOUB, B.D. *Principles and Practice of Clinical Virology*, Fifth Edition. John Wiley & Sons, 2004.

ANEXO

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você esta sendo convidado a participar de um estudo que tem por objetivo investigar a infecção de rotavírus no município de Guarapuava, PR.

Para a participação da criança neste estudo você, responsável, deverá autorizar que a amostra de fezes já coletada, seja utilizada para detecção e genotipagem de rotavírus. Se concordar em participar garantimos sigilo das informações e não o aparecimento do nome da criança nem seu nome. Sua participação é voluntária, o Sr (a) não terá nenhum tipo de despesa em participar da pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. O Sr (a) tem liberdade de participar do estudo ou desistir a qualquer momento. Nenhum dos procedimentos oferece risco a sua dignidade ou saúde, isto é, não envolve riscos diretos ao Sr (a). Os resultados deste estudo serão utilizados e divulgados em eventos científicos, nos quais os pesquisadores se comprometem a divulgar os resultados obtidos.

Pesquisador responsável: Emerson Carraro

Email: emersoncarraro@bol.com.br

Fone: 36298137 horário: 8:00 às 11:00 e das 13:30 às 17:30.

Eu _____ declaro que estou dispondo-me a esta pesquisa, li o termo acima e entendi o objetivo do estudo do qual fui convidado a participa. Entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que este afete meu trabalho e autorizo voluntariamente a utilização do material clínico do meu dependente _____ nas atividades da pesquisa.

Assinatura do pesquisador

Assinatura do responsável

Guarapuava, _____ de _____ de 201__