

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**LUCIANE APARECIDA PEREIRA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DOS ROTAVÍRUS DO GRUPO A  
DETECTADOS EM CRIANÇAS COM INFECÇÕES  
GASTROINTESTINAIS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UFPR NO  
PERÍODO DE 2001 A 2008**

**CURITIBA  
2011**

**LUCIANE APARECIDA PEREIRA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DOS ROTAVÍRUS DO GRUPO A  
DETECTADOS EM CRIANÇAS COM INFECÇÕES  
GASTROINTESTINAIS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UFPR NO  
PERÍODO DE 2001 A 2008**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, área de concentração em Doenças Infecciosas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sonia Mara Raboni

**CURITIBA  
2011**

*Aos meus pais, Luiz Carlos e Dilceia.  
Ao Paulo Henrique, meu companheiro.  
Ao meu irmão Fábio.  
Por me apoiarem em todos os  
momentos da minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos os que estiveram presentes direta ou indiretamente na realização deste trabalho, em especial:

A Deus, pela saúde, proteção e luz em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, Dr.<sup>a</sup> Sonia Mara Raboni, pela orientação, pelo incentivo e apoio recebidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Luine Rosele Vidal, Meri Bordignon Nogueira, Sergio Monteiro de Almeida, Gislene de Almeida Takahashi, Marcirene Abinoski Andriow, Clyete Santos da Silveira, Indianara Rota, Barbara Maria Cavalli, Adelina Moraes, Elenice Stroparo, Carla Elizabeth de Oliveira Ferreira, Luís Felipe Pessa, Giovana Duarte Turchetto, pelo apoio e incentivo.

À amiga Maria do Carmo Debur, por sempre estar pronta a me ajudar, dando sugestões e palavras de incentivo.

À Dr.<sup>a</sup> Cristina Cruz, pela colaboração na análise dos dados clínicos.

Ao Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite, pela pronta disponibilidade com que nos atendeu ao ser solicitado.

Aos meus amigos e amigas, por sempre estarem presentes com uma palavra de incentivo.

Aos meus sobrinhos, Isabelle e Fabrício, pela alegria que trouxeram a nossa família e a todos meus familiares pelo apoio recebido e carinho.

Luciane Aparecida Pereira

*A melhor de todas as coisas é aprender.  
o dinheiro pode ser perdido ou roubado,  
a saúde e força podem falhar,  
mas o que você dedicou à sua mente  
é seu para sempre.*

(Louis L.Amour)

## RESUMO

Os rotavírus do grupo A (RVA) são os principais agentes etiológicos das gastroenterites virais em crianças menores de 5 anos em todo o mundo. No Brasil, esse vírus tem sido descrito como causa de hospitalização em pacientes pediátricos em aproximadamente 20 a 30% dos casos. Devido à ampla variabilidade genética que os RVA possuem, é importante o constante monitoramento epidemiológico e laboratorial desses agentes, visando analisar a eficácia das vacinas e sua influência nos resultados das metodologias diagnósticas disponíveis até o momento. Os objetivos deste estudo, de caráter retrospectivo, descritivo e com amostras de conveniência foram: avaliar a variabilidade genética dos RVA identificados em amostras clínicas provenientes de pacientes com infecções gastrointestinais internados e ambulatoriais no Hospital de Clínicas da UFPR, avaliar e correlacionar dados clínicos epidemiológicos e laboratoriais relacionados à infecção por RVA durante o período de abril de 2001 a dezembro de 2008. As técnicas utilizadas neste estudo foram a aglutinação em látex (AL), o ensaio imunoenzimático (EIE), a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e a transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (*nested RT-PCR multiplex*). Foram analisadas 1.140 amostras, das quais 179 (15,7%) foram positivas para RVA e 80 (44,7%) amostras foram submetidas a *nested RT-PCR multiplex*. Os genótipos encontrados de maior frequência para o tipo G (proteína VP7) foram: G4 (31,9%), G1 (25,0%), G9 (15,3%) e G2 (7,0%) e para os genótipos P (proteína VP4) foram: P[8] (88,5%) e P[4] (11,5%). As associações entre os genótipos G e P mais frequentes encontradas foram: G4 P[8] (31,9%), G1 P[8] (19,4%), G9 P[8] (11,1%) e G2 P[4] (6,9%). Não foram verificadas infecções mistas. Conforme relato prévio, a partir de 2006, após a introdução da vacina no Calendário Básico de Imunizações Brasileiro, observou-se neste estudo a reemergência do genótipo G2 P[4], bem como uma maior circulação do genótipo G9. A infecção por RVA ocorreu em 62,5% de crianças menores ou igual a 12 meses de idade, sendo que 55,6% tiveram desidratação grave e 26,7% necessitaram de atendimento em UTI. Para as infecções nosocomiais por RVA, foi encontrada uma prevalência de 12,5%. Não foi observado correlação entre o genótipo e a gravidade da infecção nos pacientes analisados.

**Palavras-chave:** Diarreia. Rotavírus. Diagnóstico. Gastroenterite. Vacinas. EGPA. Genótipos. RT-PCR. Genotipagem.

## ABSTRACT

The group A rotaviruses (RV) are the main etiological agents of viral gastroenteritis in children under 5 years old worldwide. In Brazil, this virus has been described as a cause of hospitalization among pediatric patients in 20 to 30% of the cases. Due wide genetic variability of RV, the constant epidemiological and laboratorial monitoring is important, in order to analyze the effectiveness of vaccines and their influence on the diagnosis methodology results available until the moment. The aim of this retrospective, descriptive and with convenience samples study was: to evaluate the genetic variability of group A RV of patients with acute gastroenteritis inpatients and outpatients from the Hospital de Clínicas in Curitiba, Parana, to evaluate and correlate the clinical, epidemiological and laboratorial data related to RVA infection during the period of April 2001 to December 2008. The techniques used in the study were the latex agglutination (AL), the enzyme immunoassay (EIA), the polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and the reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR). Were analyzed 1.140 samples, from these 179 (15.7%) were positive for group A RV and 80 (44,7%) samples were submitted by *nested* RT-PCR *multiplex*. The frequency of genotypes for genotype G (protein VP7) was, G4 (31.9%), G1 (25.0%), G9 (15.3%) and G2 (7.0%); for genotype P (protein VP4), was: P [8] (88.5%) and P [4] (11.5%). Associations between genotypes G and P the most were: G4 P[8] (31.9%), G1 P[8] (19.5%), G9 P[8] (11.1%) e G2 P[4] (6.9%). No mixed infections were found. As previously reported since 2006, after the introduction of vaccination in Brazilian Basic Immunization Calendar, re-emergence of genotypes P [4], G2, and the largest circulation of genotype G9 was observed. RV infection occurred in 62.5% of children under or equal to 12 months of age, from these 55.6% had severe dehydration and 26.7% needed care in ICU. For nosocomial it was infections for RVA, found a prevalence of 12.5%. There was no correlation between genotype and severity of infection in examined patients.

**Keyword:** Diarrhea. Rotavirus. Diagnosis. Gastroenteritis. Vaccine. EGPA. Genotypes. RT-PCR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA MORFOLOGIA DOS ROTAVÍRUS.....	18
FIGURA 2 - CORTE TRIDIMENSIONAL DA PARTÍCULA VIRAL INDICANDO AS CAMADAS PROTEICAS DOS RVA.....	19
FIGURA 3 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS SEGMENTOS DO GENOMA DE RVA .....	22
FIGURA 4 - TOTAL DE AMOSTRAS COLETADAS E POSITIVAS PARA RVA NAS METODOLOGIAS DE EIE E AL NO PERÍODO DE 2001 A 2008 NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO HC-UFPR .....	43
FIGURA 5 - RESULTADO DA ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE FEZES PARA INVESTIGAÇÃO DE RVA NAS TRÊS METODOLOGIAS NO PERÍODO DE 2001 A 2008 NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO HC-UFPR.....	44
FIGURA 6 - DIAGNÓSTICO DE RVA – TABELA DE CONTINGÊNCIA E CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DOS TESTES DE DETECÇÃO DE ANTÍGENOS.....	45
FIGURA 7 - AMOSTRAS DE RVA POSITIVAS REPRESENTATIVAS DO PERÍODO ESTUDADO (2001 A 2008). ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (EGPA).....	46
FIGURA 8 - GEL DE AGAROSE A 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO O RESULTADO DA REAÇÃO DE RT-PCR ONDE SE VISUALIZA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PARA AS PROTEÍNAS VP4 E VP7 DO CONTROLE POSITIVO SiRV-A/SA11 .....	47
FIGURA 9 - GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO O TESTE DA <i>nested</i> RT-PCR <i>multiplex</i> DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA O TIPO G (VP7) .....	48
FIGURA 10 - RESULTADO DA DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS TIPO G DE RVA DETECTADOS NAS AMOSTRAS DE FEZES COLETADAS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS EM CURITIBA-PR DURANTE OS ANOS DE 2001 A 2008.....	49
FIGURA 11 - GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO OS TESTES DA <i>nested</i> RT-PCR <i>multiplex</i> DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA O GENÓTIPO P (VP4) .....	49



FIGURA 12 - RESULTADO DA DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS TIPO P DE RVA DETECTADOS NAS AMOSTRAS DE FEZES COLETADAS NA CIDADE DE CURITIBA-PR DURANTE OS ANOS DE 2001 A 2008.....	50
FIGURA 13 - RESULTADO DA GENOTIPAGEM DAS AMOSTRAS DE FEZES ANALISADAS POR <i>nested RT-PCR multiplex</i> DURANTE OS ANOS DE 2001 A 2008 NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UFPR, NA CIDADE DE CURITIBA - PARANÁ.....	51
FIGURA 14 - FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES HOSPITALIZADOS E AMBULATORIAIS ATENDIDOS NO HC-UFPR NA CIDADE DE CURITIBA-PR DURANTE OS ANOS DE 2001 A 2008 .....	52
FIGURA 15 - PREVALÊNCIA DA GASTROENTERITE AGUDA CAUSADA PELOS RVA POR FAIXA ETÁRIA DURANTE OS ANOS DE 2001 A 2008.....	53
FIGURA 16 - SEXO DOS PACIENTES ATENDIDOS COM GASTROENTERITE NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UFPR NA CIDADE DE CURITIBA-PR DURANTE OS ANOS DE 2001 A 2008.....	53
FIGURA 17 - SAZONALIDADE DOS RVA ENTRE OS ANOS DE 2001 A 2008 NA CIDADE DE CURITIBA-PR.....	54
FIGURA 18 - FREQUÊNCIA DA DESIDRATAÇÃO POR RVA NOS DOIS GRUPOS ETÁRIOS $\leq 12$ MESES E $> 12$ MESES .....	58
FIGURA 19 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DE RVA NOS DOIS GRUPOS ETÁRIOS $\leq 12$ MESES E $> 12$ MESES .....	58
FIGURA 20 - COMPARAÇÃO ENTRE PRESENÇA DE DESIDRATAÇÃO E GENÓTIPOS DE RVA .....	59

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA A RT-PCR E A GENOTIPAGEM DE RVA PARA A PROTEÍNA VP7 .....	41
QUADRO 2 - SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA A RT-PCR E A GENOTIPAGEM DE RVA PARA A PROTEÍNA VP4 .....	41
QUADRO 3 - DADOS DOS PACIENTES QUE APRESENTARAM INFECÇÃO NOSOCOMIAL POR RVA.....	60

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RESULTADO DA ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE FEZES PARA INVESTIGAÇÃO DE RVA NO PERÍODO DE 2001 A 2008 NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO HC-UFPR.....	44
TABELA 2 - RESULTADO DA ANÁLISE DOS GENÓTIPOS PARA A PROTEÍNA VP7 (TIPO G) NAS AMOSTRAS DE FEZES PARA RVA NO PERÍODO DE 2001 A 2008 NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO HC-UFPR.....	48
TABELA 3 - RESULTADO DA ANÁLISE DOS GENÓTIPOS PARA A PROTEÍNA VP4 (TIPO P) NAS AMOSTRAS DE FEZES PARA RVA NO PERÍODO DE 2001 A 2008 NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO HC-UFPR.....	50
TABELA 4 - RESULTADO DA ANÁLISE DOS GENÓTIPOS PARA A PROTEÍNA VP7 (TIPO G) E VP4 (TIPO P) NAS AMOSTRAS DE FEZES PARA RVA NO PERÍODO DE 2001 A 2008 NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO HC-UFPR .....	51
TABELA 5 - LOCAL DE INTERNAMENTO DOS PACIENTES ATENDIDOS COM GASTROENTERITE AGUDA POR RVA NA CIDADE DE CURITIBA ENTRE OS ANOS DE 2001 A 2008.....	55
TABELA 6 - DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES ATENDIDOS COM GASTROENTERITE AGUDA POR RVA NA CIDADE DE CURITIBA ENTRE OS ANOS DE 2001 A 2008.....	56
TABELA 7 - AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DA DESIDRATAÇÃO PELA INFECÇÃO POR RVA EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS DOS PACIENTES INTERNADOS E AMBULATORIAIS NA CIDADE DE CURITIBA ENTRE OS ANOS DE 2001 A 2008 .....	57

## LISTA DE SIGLAS

AL	- Aglutinação em partículas de látex
cDNA	- Ácido desoxirribonucleico complementar
dATP	- 2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	- 2'-deoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	- 2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato
dNTP	- Deoxinucleotídeos trifosfatados ( <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i> )
dTTP	- 2'-deoxitimidina 5'-trifosfato
NTPase	- Nucleosídeo 5'-trifosfatase
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DEPC	- Dietilpirocarbonato
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
EGPA	- Eletroforese em gel de poliacrilamida
EIE	- Ensaio imunoenzimático
mRNA	- RNA mensageiro
NaOH	- Hidróxido de sódio
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PCR	- Reação em cadeia da polimerase ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pb	- Pares de base
pH	- Potencial hidrogeniônico
pmol	- Picomol
q.s.p.	- Quantidade suficiente para
RNA	- Ácido ribonucleico
RPM	- Rotação por minuto
RT-PCR	- Transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase
RV	- Rotavírus
RVA	- Rotavírus do grupo A
SDS	- Dodecil sulfato de sódio ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
seg.	- Segundo(s)
SVS	- Secretaria de Vigilância em Saúde
TBE	- Tampão Tris-Borato-EDTA
Tris	- (Hidroximetil)-aminometano

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 OBJETIVOS.....	14
1.1.1 objetivo geral .....	14
1.1.2 Objetivos específicos.....	14
1.2 JUSTIFICATIVA.....	14
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS .....	16
2.2 DESCRIÇÃO DO VÍRUS .....	17
2.2.1 Classificação e morfologia.....	17
2.2.2 Análise de eletroferotipos dos RVA .....	21
2.2.3 Replicação viral .....	22
2.3 TRANSMISSÃO E PATOGENIA.....	23
2.4 EPIDEMIOLOGIA .....	24
2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E IMUNIDADE .....	27
2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DOS RVA .....	29
2.7 TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA INFECÇÃO POR RVA.....	31
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
3.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO .....	34
3.2 AMOSTRAS.....	34
3.2.1 Critérios de inclusão .....	35
3.2.2 Critérios de exclusão .....	35
3.3 APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA .....	35
3.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS .....	36
3.5 DETECÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL.....	36
3.5.1 Aglutinação em partículas de látex (AL) .....	36
3.5.2 Ensaio imunoenzimático (EIE).....	37
3.6 DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL .....	37
3.6.1 Controle positivo e negativo .....	37
3.6.2 Extração do RNA viral .....	37
3.6.3 Análise eletroforética (EGPA).....	38

3.6.4	Transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	39
3.6.5	Genotipagem por <i>nested</i> RT-PCR <i>multiplex</i> .....	40
3.6.6	Análise dos produtos amplificados .....	41
3.7	INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS.....	42
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
4.1	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL .....	43
4.1.1	Características operacionais dos testes diagnósticos de detecção de antígenos virais.....	44
4.1.2	Variabilidade genética dos RVA .....	46
4.2	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PARA OS GENÓTIPOS G E P .....	47
4.2.1	Detecção dos genótipos G (VP7) .....	47
4.2.2	Detecção dos genótipos P (VP4).....	49
4.3	DADOS DEMOGRÁFICOS.....	52
4.4	SAZONALIDADE DAS INFECÇÕES POR RVA.....	54
4.5	LOCAL DE INTERNAMENTO.....	55
4.6	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS DA INFECÇÃO POR RVA.....	55
4.7	GENÓTIPOS E GRAVIDADE .....	57
4.8	PACIENTES INTERNADOS QUE APRESENTARAM INFECÇÕES NOSOCOMIAIS POR RVA .....	60
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>74</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>75</b>
	<b>APÊNDICE 1 - PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE ROTAVÍRUS</b> .....	<b>105</b>
	<b>APÊNDICE 2 - PROTOCOLO DE RT-PCR PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA VP7 DOS RVA</b> .....	<b>106</b>
	<b>APÊNDICE 3 - PROTOCOLO DE <i>nested</i> RT-PCR PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA VP7 DOS RVA</b> .....	<b>107</b>
	<b>APÊNDICE 4 - PROTOCOLO DE RT-PCR PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA VP4 DOS RVA</b> .....	<b>108</b>

<b>APÊNDICE 5 - PROTOCOLO DE <i>nested</i> RT-PCR <i>multiplex</i> PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA VP4 DOS RVA .....</b>	<b>109</b>
<b>APÊNDICE 6 - FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS CLÍNICOS EPIDEMIOLÓGICOS (1/1).....</b>	<b>110</b>
<b>APÊNDICE 7 - ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO - PREPARO DE REAGENTES E TÉCNICAS .....</b>	<b>125</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os rotavírus do grupo A (RVA) são os principais agentes etiológicos das diarreias em crianças abaixo de 5 anos de idade. Em escala global, são responsáveis por aproximadamente 611.000 mortes por ano, principalmente em países em desenvolvimento (PARASHAR *et al.*, 2006). Nos países desenvolvidos, a taxa de mortalidade é bastante reduzida, porém admite-se que todas as crianças até os 5 anos já tenham apresentado pelo menos um episódio de diarreia por RVA (PARASHAR *et al.*, 2003). Com esse impacto na saúde em todo o mundo, diversos estudos foram desenvolvidos para reduzir tanto a morbidade quanto a mortalidade causadas pelos RVA. Programas de vigilância têm sido criados com o objetivo de monitorar a diversidade dos RVA que circulam na população. Países como os Estados Unidos e a Austrália apresentam programas de vigilância genotípica desde 1993 e recentemente a vigilância foi implantada também na África (African Rotavirus Network) e na Ásia (Asian Rotavirus Surveillance Network). No Brasil, a vigilância epidemiológica para a doença diarreica por RVA foi instituída em 2006 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A Organização Mundial da Saúde, a Aliança Global para Vacinas e Imunizações e outros órgãos avaliaram a necessidade de priorizar o desenvolvimento de novas vacinas contra RVA (GLASS *et al.*, 2005). O Brasil foi o primeiro país do mundo a oferecer a vacina contra RVA na rede pública de saúde, desde 2006, a Rotarix<sup>®</sup>, da GlaxoSmithKline Biologicals, faz parte do Calendário Básico de Imunizações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A existência de diferentes combinações entre os genótipos G e P e com a introdução da nova vacina no Calendário Nacional Básico de Imunizações Brasileiro, há necessidade de um constante monitoramento para identificar os genótipos e a variabilidade genética das amostras circulantes, bem como o surgimento de amostras emergentes e reemergentes de RVA, para que medidas efetivas sejam tomadas o mais precocemente possível. Também é importante analisar a eficácia das vacinas que estão disponíveis, bem como a sua influência nos resultados das metodologias diagnósticas atualmente disponíveis (SANTOS; HOSHINO, 2005; ANDREASI *et al.*, 2007).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a variabilidade genética dos RVA identificados em amostras clínicas provenientes de pacientes internados e ambulatoriais no Hospital de Clínicas da UFPR por infecções gastrointestinais em um período de oito anos.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar as características operacionais dos testes diagnósticos para detecção de antígenos de RVA disponíveis no HC-UFPR no período do estudo.
- Identificar por meio de *nested* RT-PCR as variantes antigênicas do RVA em cada ano.
- Avaliar dados clínicos/epidemiológicos/laboratorial relacionados à infecção por RVA.
- Correlacionar os dados clínicos e epidemiológicos com a variabilidade antigênica dos RVA.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma correlação clara entre o período de circulação dos RVA com um aumento no número de internamentos de pacientes pediátricos, assim como um acréscimo nos índices de mortalidade infantil. Surtos que são apenas clinicamente estimados e não são confirmados por metodologias laboratoriais, dificultam a atuação da vigilância sanitária. Com a caracterização dos RVA pode-se conhecer o período de sua incidência e os sorotipos circulantes, cujas informações orientam medidas profiláticas preventivas que evitariam gastos com os



internamentos, assim como a superlotação dos leitos hospitalares. Para os pacientes imunossuprimidos os benefícios seriam maiores, pois evitariam a necessidade de consumo de mais medicamentos que poderiam agravar o seu estado já bastante delicado.

Embora uma terapia antiviral específica para os RVA não esteja disponível, a identificação dos pacientes infectados é importante para prevenir a transmissão nosocomial, entender o impacto clínico das infecções e suas manifestações clínicas.

Apesar da introdução da nova vacina no Calendário Nacional Básico de Imunizações Brasileiro, as admissões hospitalares para os casos graves da infecção, ainda persistem no HC - UFPR. Isso pode ser explicado pela ocorrência da doença em pacientes com fatores de risco que não responderam à vacina ou não foram vacinados. Portanto, é indispensável proceder ao diagnóstico laboratorial da doença, bem como monitorar a variabilidade genética viral, visando analisar a eficácia das vacinas e sua influência nos resultados das metodologias diagnósticas até o momento disponíveis.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

Os RVA foram descritos pela primeira vez por Bishop *et al.*, em 1973, na Austrália, em estudos de biópsia de mucosa duodenal de crianças com diarreia por meio da microscopia eletrônica. No mesmo ano, na Inglaterra, Flewett, Bryden e Davies também encontraram partículas virais nas fezes de crianças com diarreia aguda. Inicialmente uma polêmica quanto ao nome a ser dado a este novo agente etiológico de diarreia aguda em humanos. Bishop *et al.* (1973) sugeriram orbivírus, pela morfologia da partícula viral, Flewett, Bryden e Davies (1973), por meio da observação em microscopia eletrônica, propuseram RVA, devido a sua semelhança com roda de carroça (do latim *rota*), e Davidson *et al.* (1975) recomendaram duovírus, pelo local onde o vírus foi detectado pela primeira vez, a mucosa duodenal. Somente em 1979, no 4.º Congresso Internacional de Virologia, o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) definiu e oficializou o termo Rotavírus (BISHOP *et al.*, 1973; FLEWETT, BRYDEN; DAVIES, 1973; DAVIDSON *et al.*, 1975).

No Brasil, os RVA foram descritos pela primeira vez por Linhares *et al.*, em 1977, durante as investigações de quadros de diarreia em crianças atendidas no hospital público da Santa Casa de Misericórdia, no Pará. Desde então, inúmeros outros estudos deram início no país, sendo os RVA considerados os principais agentes etiológicos das diarreias graves infantis em países desenvolvidos e em desenvolvimento (LINHARES *et al.*, 1977; LINHARES *et al.*, 1988; TIMENETSKY; SANTOS; GOUVEA, 1994b; LEITE *et al.*, 1996; LINHARES, 1997; MASCARENHAS *et al.*, 1999; LINHARES, 2000; MENEGHETTI *et al.*, 2001; KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001; SOUZA *et al.*, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2007a; GURGEL *et al.*, 2008).

## 2.2 DESCRIÇÃO DO VÍRUS

### 2.2.1 Classificação e morfologia

A família *Reoviridae* é dividida em dois grupos, um com cinco gêneros, sendo eles: os *Orthoreovirus*, *Cypovirus*, *Aquareovirus*, *Fujivirus* e *Oryzavirus*, que apresentam como característica grandes projeções situadas nos 12 vértices da estrutura icosaédrica. O segundo grupo é formado pelos *Rotavirus*, *Orbivirus*, *Coltivirus* e *Phytoreovirus*, que possuem como característica um capsídeo mais liso ou quase esférico e sem grandes projeções. As partículas virais da família *Reoviridae* apresentam 10,11 ou 12 segmentos genômicos, constituídos de RNAs de fita dupla lineares (van REGENMORTEL *et al.*, 2000) (Figura 1). O gênero RV possui simetria icosaédrica, a partícula viral completa mede aproximadamente 70-90nm de diâmetro, não é envelopado e é constituído por três camadas proteicas. O genoma viral é constituído de 11 segmentos de RNA de fita dupla (RNAf.d.), nos quais são codificadas seis proteínas estruturais (Viral Protein), VP1-4, VP6 e VP7, e seis não estruturais (Not Structural Protein), NSP1-6 (DESSELBERGER, 1989; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

No capsídeo interno ou “core” estão presentes as proteínas VP1 (125kDa), codificada pelo segmento 1, considerada a RNA polimerase dos RV, a VP2 (94kDa), segmento 2, a mais abundante do “core” viral e altamente imunogênica, e a VP3 (88kDa), codificada pelo segmento 3, a qual apresenta atividade de guaniltransferase. A proteína VP1 e VP3 ligam-se diretamente ao RNA (ESTES; COHEN, 1989; PATTON; CHEN, 1999). Na camada intermediária, está a proteína VP6 (41kDa), altamente antigênica e imunogênica, comportando os antígenos de grupo e subgrupo dos RVA.

No capsídeo externo encontram-se as proteínas VP4 e VP7, responsáveis pelas interações iniciais do vírus com a célula hospedeira. A proteína VP7 (37kDa) é uma glicoproteína, altamente imunogênica, apresentando o antígeno específico para sorotipo e genótipo de RVA do capsídeo externo; é a segunda mais abundante e constitui 30% da proteína do vírion. Forma a matriz do capsídeo, sendo responsável pela indução dos anticorpos neutralizantes, incluindo aqueles sorotipo-específicos (MATTION; COHEN; ESTES, 1994). A proteína VP4 possui massa molecular de 88

kDa, 775 aminoácidos e constitui 1,5% da proteína do vírion. Constitui-se em uma hemaglutinina e pode sofrer clivagem proteolítica resultando na formação dos peptídeos VP5 (60 kDa) e VP8 (28 kDa), que são ligados por um peptídeo de conexão sensível à ação de proteases, formando espículas virais. É a proteína responsável pela ligação dos RVA aos enterócitos, sendo associada a diversas funções biológicas, tais como: atividade hemaglutinante de algumas amostras de RVA, restrição ao crescimento em culturas de células e virulência (Figura 2) (ZÁRATE *et al.*, 2000; ESTES, 2001).

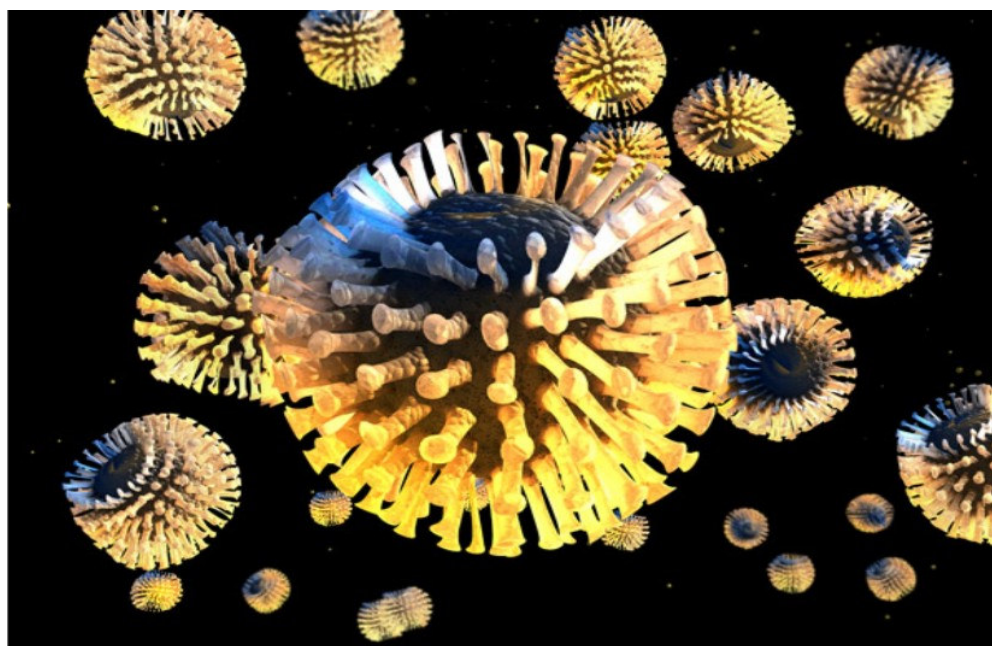


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA MORFOLOGIA DOS ROTAVÍRUS  
FONTE: [www.carlgoodman.co.uk/.../scientific-1.html](http://www.carlgoodman.co.uk/.../scientific-1.html)

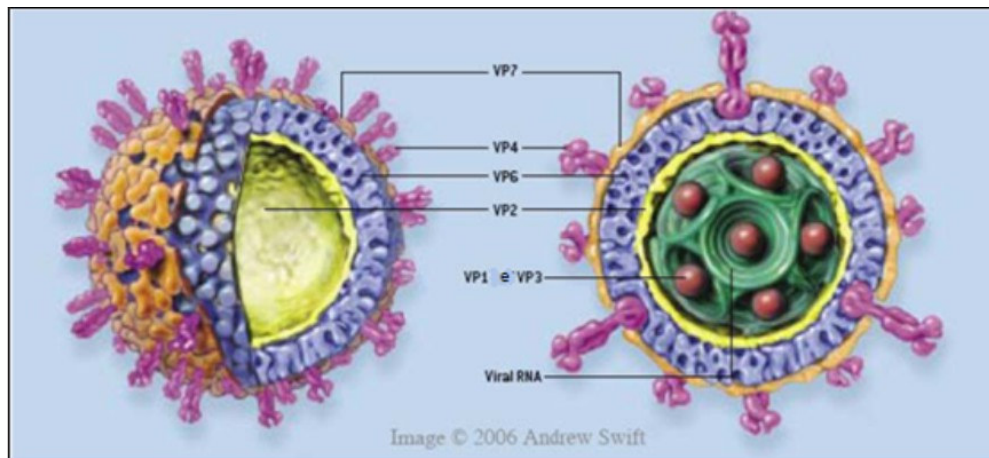


FIGURA 2 - CORTE TRIDIMENSIONAL DA PARTÍCULA VIRAL INDICANDO AS CAMADAS PROTEICAS DOS RV

FONTE: Adaptado de Glass *et al.* (2006)

NOTA: VP1, VP2 e VP3: core viral; VP6: camada intermediária e VP4 e VP7: camada externa.

As seis proteínas não estruturais (NSP) identificadas de NSP1 a NSP6 são encontradas nas células infectadas e codificadas respectivamente pelos segmentos 5,7,8,10,11. A NSP4 codificada pelo segmento 10 tem sido muito estudada, pois desempenha um importante papel na morfogênese viral e na virulência, atuando como uma enterotoxina (BALL *et al.*, 1996; RAMIG, 2004).

São conhecidos sete grupos distintos de RV até o momento, denominados de A a G, os quais são caracterizados pelas diferenças antigênicas encontradas na proteína VP6. Essa proteína constitui o capsídeo intermediário dos RV, compondo cerca de 51% do vírion, sendo, portanto, a proteína mais abundante. Os RV pertencentes ao grupo A, B e C têm sido identificados tanto em humanos como em animais, enquanto os do grupo D, F e G foram descritos somente em animais (ESTES, 2001; RAHMAN *et al.*, 2005). Os grupos B a G não são detectados por técnicas sorológicas convencionais, em função da proteína VP6 ser diferente da encontrada nos RVA (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001).

Os RVA também são classificados em quatro subgrupos (I, II, I e II, não I e não II), utilizando determinantes antigênicos localizados na proteína VP6 (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001; CIARLET; ESTES, 2002). Posteriormente, a partir da caracterização molecular, reorganizou-se esta classificação em somente dois genogrupos, o genogrupo I: SGI e genogrupo II: SGII, SGI+ II, e SG não-I, não-II (ITURRIZA-GÓMARA *et al.*, 2002).

Com base na especificidade antigênica das proteínas do capsídeo externo, a VP4 e VP7, os RVA são classificados ainda em sorotipos e/ou genótipos. Os sorotipos são determinados por ensaios utilizando soro hiperimune ou anticorpos monoclonais e os genótipos por meio do sequenciamento, amplificação ou hibridização dos genes que codificam essas proteínas (SANTOS, 2002).

De acordo com a especificidade da proteína VP7, os sorotipos são designados de G, devido ao fato de essa proteína ser glicosilada (ESTES, 2001). São conhecidos até o momento pelo menos 15 sorotipos e 23 genótipos G (G1–G23), identificados com base na análise da sequência do gene VP7 (ABE *et al.*, 2009; URSU *et al.*, 2009; ALADIN *et al.*, 2010).

Os sorotipos baseados na especificidade da proteína VP4 são designados de P, por serem sensíveis à protease. A clivagem proteolítica da VP4 resulta na formação dos peptídeos VP5 e VP8. O peptídeo VP5 está associado à atividade de neutralização cruzada entre diferentes tipos de VP4, enquanto a VP8 contém a maioria dos epítomos associados a reações tipo-específicas. Devido à ocorrência de reações cruzadas causadas pelo peptídeo VP5, não se estabeleceu ainda uma correspondência para a proteína VP4 entre os resultados obtidos por métodos sorológicos e os obtidos por genotipagem. O estudo do gene que codifica a proteína VP4, pelo sequenciamento de nucleotídeos, estabeleceu até o momento 31 genótipos P (P[1]–P[31]) e somente 15 sorotipos (P1A, P1B e P2 A P14) de RVA (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001; ESTES; KAPIKIAN, 2007; SCHUMANN *et al.*, 2009, ABE *et al.*, 2009; ALADIN *et al.*, 2010). Pelas várias limitações apresentadas pelos métodos sorológicos, a genotipagem passou a ser adotada como melhor opção para a caracterização dos RVA, possibilitando o acesso a importantes informações sobre a epidemiologia desses agentes (GOUVEA *et al.*, 1990; GENTSCH *et al.*, 1996).

A classificação dos RVA é dada com base em um sistema binário representado pelas proteínas VP4 (gene 4) e VP7 (gene 9) (ESTES, 2001; KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001). Na nomenclatura atual, os RVA são especificados primeiro com o sorotipo P, se disponível, depois pelo genótipo P entre colchetes, seguido pelo genótipo G, como, por exemplo, a amostra protótipo "Wa", designada P1A[8] G1.

Além das proteínas VP4, VP6 e VP7, também foi especificada em RV humano e animal a proteína não estrutural NSP4 (gene 10), nas quais foram identificados cinco genótipos, A-E, diferentes, dos tipos G e P (KIRKWOOD, PALOMBO, 1997; CIARLET *et al.*, 2000; LIN; TIAN, 2003). Recentemente um novo sistema de

classificação para os RVA foi proposto por Matthijnsens *et al.* (2008b), baseado nas propriedades moleculares dos 11 segmentos de seu genoma. Por meio dessa análise foram descritos os seguintes genótipos: 13 I (VP6- capsídeo intermediário), 6 R (VP1- RNA polimerase), 6 C (VP2- proteína do core), 7 M (VP3- metiltransferase), 16 A (NSP1- antagonista do interferon), 6 N (NSP2- NTPase), 8 T (NSP3- intensificadora de tradução), 12 E (NSP4- enterotoxina) e 8 H (NSP5- fosfoproteína) (MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008b; MATTHIJNSSENS *et al.*, 2009b; SOLBERG *et al.*, 2009; TROJNAR; OTTO; JOHNE, 2009; URSU *et al.*, 2009). Esse sistema de classificação permitirá descrever transmissões interespecies e rearranjos de cepas de RV humano e animal (RAHMAN *et al.*, 2007; TSUGAWA; HOSHINO, 2008; MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008a; MATTHIJNSSENS *et al.*, 2009a; SCHUMANN *et al.*, 2009).

### 2.2.2 Análise de eletroferotipos dos RVA

O perfil característico dos segmentos genômicos dos RVA pode ser observado pela sua disposição após uma eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Os segmentos são distribuídos em quatro classes de tamanho, sendo numerados pela ordem de migração no gel: classe I (genes 1,2,3 e 4), classe II (genes 5 e 6), classe III (genes 7,8 e 9) e classe IV (genes 10 e 11).

Por meio da análise do perfil eletroforético pode-se caracterizar as amostras de RVA obtidas em cultura celular e isolada de fezes, revelando a cocirculação de amostras com perfis diferentes durante uma epidemia. A migração dos segmentos 10 e 11 define três perfis distintos: longo (L), curto (S) e supercurto (SS), sendo utilizados na classificação dos RVA (MATSUI *et al.*, 1990; KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001). A diversidade de eletroferotipos deve-se talvez a eventos como: mutações, rearranjos e reagrupamentos que podem ocorrer nas infecções mistas (Figura 3) (LOURENÇO *et al.*, 1981; SANTOS *et al.*, 2008).

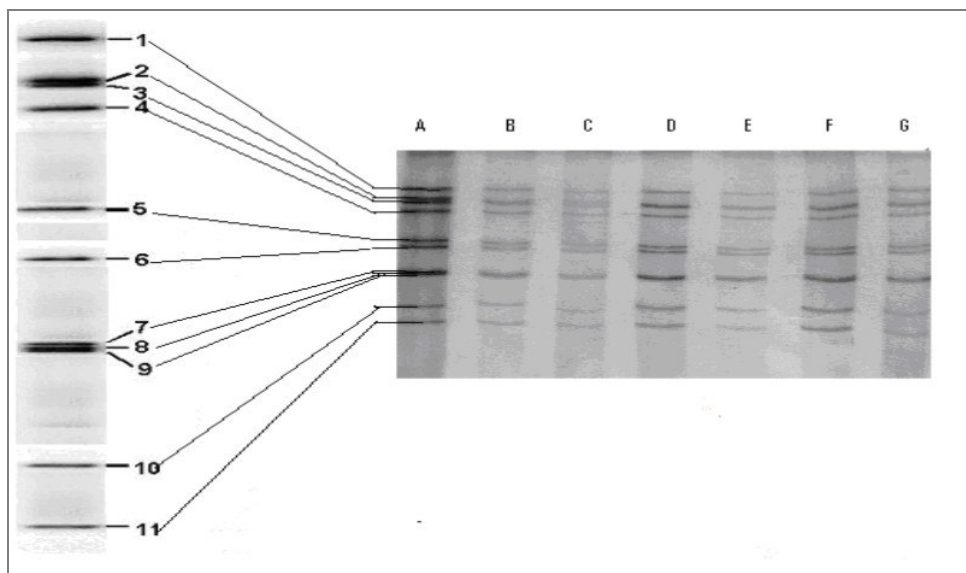


FIGURA 3 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS SEGMENTOS DO GENOMA DE RVA

FONTE: O autor (2011)

NOTA: À ESQUERDA- Representação dos 11 segmentos dos RVA; À DIREITA- Gel de poliacrilamida e corado com nitrato de prata na técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Linha A controle positivo:cultura celular da cepa SiRV-A/SA11; Linhas B a G amostras positivas para rotavírus do grupo A de pacientes do Hospital de Clínicas.

### 2.2.3 Replicação viral

As células MA-104 (linhagem celular fetal derivada de rim do macaco rhesus) e Caco-2 (linhagem celular derivada de carcinoma de cólon humano) têm sido utilizadas *in vitro* para elucidar a replicação dos RVA (ESTES, 1996). O principal sítio de replicação viral *in vivo* dos RVA é o intestino delgado, em particular o jejuno, especificamente nas células epiteliais maduras que revestem as microvilosidades intestinais, os enterócitos. Por meio da proteína VP4, ocorre a adsorção do vírus à célula pela utilização de receptores como o ácido siálico ou gangliosídeos. Vários eventos ocorrem antes da penetração do vírus na célula, como interações sequenciais com vários ligantes e modificações conformacionais nas proteínas do capsídeo externo. A VP4, pela ação da tripsina, sofre clivagem, dando origem a duas subunidades, a VP5 e VP8, aumentando a infecciosidade viral (ESTES, 2001; ARIAS *et al.*, 2004).

A entrada do vírus na célula pode ocorrer de duas maneiras, pela penetração direta através da membrana citoplasmática ou por endocitose (ESTES, 2001; ARIAS *et al.*, 2004). A partícula viral, após a entrada na célula, é desnudada, sendo chamada



de DLP (partícula de duas camadas), as quais são ativas na transcrição. A partir da VP1, que possui atividade de RNA polimerase RNA-dependente, são sintetizados os primeiros transcritos de RNA. Esses transcritos funcionam como fitas de RNAm, sendo que partes servem de moldes para a síntese das proteínas estruturais e não estruturais dos RVA, nos ribossomos livres, e partes, servem como moldes do RNAd., para a formação do genoma da progênie viral (ESTES, 1996).

Os processos de replicação do RNA, empacotamento do genoma e os primeiros estágios de montagem da DLP, ocorrem dentro dos viroplasmas (inclusões citoplasmáticas) (GONZALES-IOZA; POLANCO-MARIN; PUERTO-SOLIS, 2000). Ao iniciar o brotamento para o interior do retículo endoplasmático (RE), pela interação das partículas com a proteína NSP4, acontece a formação do envelope transitório, que posteriormente é substituído pelo capsídeo externo. O processo de maturação final somente ocorre com elevada concentração de íons  $Ca^{2+}$ , para a estabilização do capsídeo externo. Ao final do ciclo infeccioso, a progênie viral é liberada por lise das células hospedeiras, as quais irão infectar outros enterócitos (ALTENBURG; GRAHAM; ESTES, 1980; RAMIG, 2004).

### 2.3 TRANSMISSÃO E PATOGENIA

Os RVA são transmitidos principalmente pela via oral por meio da ingestão de água e alimentos contaminados com fezes e também pelas mãos e objetos contaminados. Estabelecimentos fechados como escolas, creches, hospitais e asilos são locais de grande propagação dos vírus (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001). Durante a fase aguda da diarreia, um trilhão de partículas virais são excretadas e apenas dez partículas já são consideradas infectantes e suficientes para causar a doença (WARD *et al.*, 1986).

Segundo alguns autores, existem relatos da transmissão por via respiratória, devido à ocorrência de doenças respiratórias em pacientes com gastroenterite por RVA e relatos de detecção de RVA no trato respiratório superior (GURWITH *et al.*, 1981; COOK *et al.*, 1990; ZHAORI *et al.*, 1991; ZHENG *et al.*, 1991).

Os RVA infectam os enterócitos maduros das vilosidades apicais do intestino delgado, que possuem função de absorção. Durante a multiplicação dos RVA,

ocorrem a morte e a descamação das células das vilosidades; esse efeito deletério de natureza litíca resulta num quadro diarreico de natureza osmótica devido ao efluxo de líquidos (LUNDGREN; SVENSSON, 2001; KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001). Foi proposto por alguns autores que, a partir do momento em que a proteína NSP4 participa do processo de replicação viral, ocorre um influxo de  $Ca^{++}$  do interior do retículo endotelial para o citoplasma, o que levaria a um desequilíbrio eletrolítico, provocando a secreção de íons  $Ca^{++}$ , ocasionando, assim, o processo diarreico (DONG *et al.*, 1997; MORRIS *et al.*, 1999). Também já foi observada a diminuição dos níveis de dissacaridasas (maltase, sacarase, lactose) e de absorção da D-xilose (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001). Dados recentes configuram o envolvimento do sistema nervoso autônomo intestinal como efetivo indutor da secreção de líquidos e eletrólitos (LUNDGREN; SVENSSON, 2003). Em termos gerais, a patogenia das infecções por RVA apresenta-se mais complexa do que a originalmente estabelecida, devido a possíveis envolvimento de múltiplos mecanismos fisiopatológicos (ESTES, 2001; KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001).

## 2.4 EPIDEMIOLOGIA

Os RVA são considerados os principais agentes de importância epidemilógica das infecções em humanos, sendo alvo das estratégias de vacinação implementadas até o momento (GENTSCH *et al.*, 1992; PARASHAR *et al.*, 2003; PARRA *et al.*, 2007). Os RV do grupo B foram associados a vários surtos de gastroenterite grave na China (KRISHNAN *et al.*, 1999). Enquanto os do grupo C foram detectados em vários locais do mundo (MACKOW, 1995; OTSU, 1998). No Brasil, os primeiros achados para este grupo foram descritos por Pereira *et al.* (1983), em uma criança portadora de diarreia aguda na cidade do Rio de Janeiro. Na sequência, vários estudos nas diversas regiões do Brasil detectaram este patógeno (PEREIRA *et al.*, 1983; GABBAY *et al.*, 1989; TEIXEIRA *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 1998).

Em indivíduos com imunodeficiência primária, principalmente as relacionadas às células T, assim como nos que foram submetidos a transplantes, os RVA podem

ocasionar diarreia crônica com excreção viral prolongada (KAPIKIAN; CHANOCK, 1996).

No Brasil, após a primeira descrição dos RVA, por meio da microscopia eletrônica, realizada por Linhares e colaboradores em 1977, inúmeros outros estudos foram realizados (PEREIRA *et al.*, 1983; TIMENETSKY; SANTOS; GOUVEA, 1994; LEITE *et al.*, 1996; ALFIERI *et al.*, 1999; MENEGHETTI *et al.*, 2001; DA ROSA E SILVA; NAVECA; PIRES DE CARVALHO, 2001; SOUZA *et al.*, 2003; SANTOS; HOSHINO, 2005). Os índices de prevalência das diarreias associadas aos RVA encontrados variaram de 12% a 42% (LINHARES, 2000; CARDOSO *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2004b; CAUÁS *et al.*, 2006; MUNFORD *et al.*, 2007). Em hospitais, aproximadamente 40% dos casos são de origem nosocomial (GUSMÃO *et al.*, 1995; WIDDOWSON *et al.*, 2000).

Estudos realizados em diversos países mostram que os RVA possuem ocorrência universal, em que se observa uma distribuição sazonal. Nos países de clima temperado, são mais frequentes nos meses mais frios, já nas regiões de clima tropical, os RVA ocorrem ao longo de todo o ano (COOK *et al.*, 1990; KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001).

Semelhante distribuição sazonal ocorre no Brasil; nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul, durante os meses mais frios, onde os índices pluviométricos são menores, ocorre a maior incidência de RVA (COIRO *et al.*, 1985; CARDOSO *et al.*, 1992; GOMES *et al.*, 1991; LINHARES, 2000). Nas regiões Norte e Nordeste, as gastroenterites por rotavírus acontecem ao longo de todo o ano (LINHARES *et al.*, 1989; STEWIEN *et al.*, 1991; CAMPOS *et al.*, 2003; CARVALHO-COSTA *et al.*, 2011).

Os principais tipos G humanos, conhecidos como usuais, de RVA são G1, G2, G3, G4 e, atualmente, representando o quinto genótipo mais comum em todo o mundo, o G9. O genótipo G1 é considerado o mais prevalente, sendo encontrado em diferentes lugares do mundo em uma frequência que varia de 36% a 74% (GENTSCH *et al.*, 2005; SANTOS; HOSHINO, 2005; KHAMRIN *et al.*, 2006). O tipos G1, G3, G4 e G9 são normalmente associados com P[8], enquanto o tipo G2 está associado ao P[4] (ESTES, 2001).

Para os RVA tipos G, além dos genótipos usuais, existem combinações consideradas como incomuns ou não usuais, descritas em todo o mundo e associadas a diarreias agudas, com frequências variáveis, em torno de 27% na

África, 14% na Ásia, 11% na América do Sul, 5% na América do Norte, 1,4% na Europa e 0,1% na Austrália (SANTOS; HOSHINO, 2005). Entre os genótipos considerados incomuns está o G5, identificado em crianças com diarreia grave no Paraguai, Camarões, Argentina, Vietnã e República Popular da China (GENTSCH *et al.*, 2005; AHMED; ANH; NAKAGOMI, 2007; DUAN *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2007a). No Brasil, esse genótipo foi encontrado na década de 1990, em crianças com diarreia (GOUVEA *et al.*, 1994b e c; LEITE *et al.*, 1996; CARMONA *et al.*, 2004). Foi descrita no Brasil uma infecção mista não usual de RVA com os tipos G5+G11 (TIMENETSKY *et al.*, 1997) e em recentes achados no Piauí, as cepas G1+G5 e combinações não usuais como P[1]G5 e P[1] +P[8]G5 (MACEDO *et al.*, 2007). Também já registrado em todo o mundo, porém com uma incidência baixa, o G12 (GRIFFIN *et al.*, 2002). Com importância epidemiológica na África foi encontrado o genótipo G8 e o genótipo G10, descrito em bovinos, foi encontrado associado a infecções em humanos na Índia (MATTHIJNSSENS *et al.*, 2006; ITURRIZA-GÓMARA *et al.*, 2004; GHOSH *et al.*, 2007). No Brasil estudos realizados apontaram uma significativa proporção de casos com os genótipos G8 e G10 associados com a diarreia aguda infantil (GOUVEA *et al.*, 1994a; LEITE *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 1998; ITURRIZA-GÓMARA *et al.*, 2004).

Para os RVA tipos P, os mais comumente encontrados em todo o mundo são P1A[8] e P1B[4], sendo os responsáveis por mais de 90% dos casos de diarreia por RVA. Entre os tipos P menos comuns, estão o P[6] detectados na África e no Brasil. (GENTSCH *et al.*, 1996, SANTOS; HOSHINO, 2005; LINHARES *et al.*, 2002). Também foi encontrado outro tipo considerado incomum em nosso território, o P[9] (LEITE *et al.*, 1996; SANTOS, 2002).

Estudos epidemiológicos realizados em todo mundo e no Brasil identificaram a circulação de cinco tipos principais de combinações de G e P, causadores da diarreia em humanos: P[8] G1; P[4] G2; P[8] G3; P[8] G4 e P[8] G9 (CASTELLO *et al.*, 2004; SANTOS; HOSHINO, 2005; GLASS; PARASHAR, 2006; ESTES; KAPIKIAN, 2007; LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES, 2008; MASCARENHAS *et al.*, 2010). A cepa P[8] G1 representa aproximadamente 65% dos tipos de RVA identificados no mundo (SANTOS; HOSHINO, 2005). Em estudos conduzidos na América Latina e na América do Norte, esse tipo foi responsável por 40% e 70% das infecções por RVA, respectivamente (CASTELLO *et al.*, 2004; SANTOS; HOSHINO, 2005). Entre os genótipos não usuais, em estudos realizados por Linhares *et al.* (2002), entre

neonatos hospitalizados, foi encontrada a circulação do genótipo P[6]G2, causando somente infecções assintomáticas (LINHARES *et al.*, 2002), também foi encontrado no Brasil em crianças com diarreia o G5P[7], comum em porcos (ESONA *et al.*, 2009).

No Brasil as frequências das combinações binárias variam de acordo com o ano e o local da amostra. Vários genótipos de RVA podem cocircular em uma mesma região a cada ano, porém somente um determinado genótipo em geral predomina durante um ou dois anos, após esse tempo, uma nova variedade antigênica dominante emerge, isso provavelmente se deva à pressão imunológica (LINHARES *et al.*, 1993; KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001; SANTOS *et al.*, 2003; ITURRIZA-GÓMARA *et al.*, 2004).

## 2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E IMUNIDADE

O período de incubação do RVA varia de 24 a 72 horas, a doença tem início abrupto com vômitos, febre, dor abdominal e diarreia aquosa profusa. Os vômitos em geral são intensos e a febre, um dos principais sintomas, ocorre em mais da metade dos casos (OLIVEIRA; LINHARES, 1999; LINHARES *et al.*, 2005). A diarreia é de carácter explosivo, com alta frequência de evacuações aquosas e geralmente autolimitada, com duração de aproximadamente três a oito dias. A excreção viral precede o início da doença propriamente dita, alcançando um pico entre 72 a 96 horas subsequentes à emergência dos sintomas (RUUSKA; VESIKARI, 1990; GREENBERG; CLARK; OFFIT, 1994; KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

As complicações mais graves da diarreia se revelam mais frequentes nas gastroenterites por RVA, se comparadas àquelas de outras etiologias infecciosas (bactérias, protozoários). As principais complicações são desidratação, desnutrição, acidose, hipernatremia, depleção de potássio e edema (LINHARES *et al.*, 1989; COLUCHI *et al.*, 2002). Infecções mistas, envolvendo RVA e outros enteropatógenos podem ocorrer com relativa frequência, contribuindo para exacerbar alguns sintomas, como, por exemplo, a dor abdominal (LINHARES, 1983; GUSMÃO *et al.*, 1995).

Um sistema de escore é utilizado para mensurar a severidade dos quadros diarreicos, este escore reúne diversos parâmetros clínicos, tais como: a duração e

frequência da diarreia, dos vômitos, da febre, se há desidratação e necessidade de tratamento. Esses parâmetros recebem uma pontuação com um somatório máximo de 20 pontos. São considerados como um quadro leve de diarreia, os escores clínicos obtidos de 0 a 8, como moderado, de 9 a 14, e acima de 14 é considerado um quadro clínico severo (FLORES *et al.*, 1987).

Há relatos de quadros atípicos associados às manifestações gastrointestinais, como as encefalites; alguns autores encontraram ácido nucleico de RVA, no líquido céfalo-raquidiano (LCR), utilizando a técnica de RT-PCR (YOSHIDA *et al.*, 1995; PANG; JOENSUU; VESIKARI, 1996; BARNES *et al.*, 1997). Porém, relatos questionam a real natureza patogênica dos RVA nas doenças do sistema nervoso central (LYNCH *et al.*, 2001). As manifestações respiratórias associadas aos vômitos também foram descritas, com detecção viral na orofaringe e no trato respiratório (ZHENG *et al.*, 1991). Alguns relatos de outros processos mórbidos, alguns incomuns, associados aos RVA também já foram descritos, destacando-se a síndrome de Kawasaki (MATSUNO; UTAGAWA; SUGIURA, 1983); o exantema súbito (SAITOH; MATSUNO; MUKOYAMA, 1981); a intussuscepção (KONNO *et al.*, 1977; NICOLAS *et al.*, 1982); o abscesso hepático (GRUNOW; DUNTON; WANER, 1985); a coagulação intravascular disseminada (LIMBOS; LIEBERMAN, 1996); a hepatite transitória (OISHI *et al.*, 1991); a enterocolite necrotizante (MOGILNER *et al.*, 1983); a pneumatose intestinal da infância (KAPIKIAN; CHANOCK, 1996). Em imunodeprimidos, crianças infectadas pelo HIV, embora haja relatos de diarreia prolongada, não foi encontrada maior gravidade na doença causada pelos RV (SAULSBURY; WINKELSTEIN; YOLKEN, 1980; OSHITANI *et al.*, 1994; CUNLIFFE *et al.*, 2001).

Os mecanismos responsáveis pela imunidade às infecções por RV não foram totalmente elucidados, vários estudos experimentais utilizando modelos animais têm ajudado a entender o papel dos anticorpos da imunidade sistêmica e local (WARD, 1996). A proteína VP6 possui potencial imunogênico, os anticorpos para esse determinante antigênico, que estão presentes nas secreções entéricas, refletem o potencial neutralizante da IgA na mucosa do intestino (LINHARES *et al.*, 2005).

Em neonatos, o curso clínico da infecção é frequentemente assintomático, ou resulta numa diarreia mais leve, provavelmente os anticorpos transferidos pelo leite materno conferem proteção (LINHARES *et al.*, 1989). Há relatos de circulação de cepas de baixa virulência entre os neonatos, as quais conferem significativa proteção

contra infecções posteriores de maior gravidade (BISHOP *et al.*, 1996; BISHOP *et al.*, 1983; BHAN *et al.*, 1993; GUSMÃO *et al.*, 1999). No entanto a proteção conferida por anticorpos maternos, transferidos via aleitamento, é controversa, uma pesquisa realizada em BÉlem, na década de 1980, não encontrou efeito protetor claro (LINHARES, 2000). A hipótese levantada é que essa proteção só ocorra para as doenças mais graves (CDC, 1999a). Segundo estudos, as infecções podem ocorrer em qualquer idade, porém a maior incidência da doença se concentra nas crianças pertencentes à faixa etária de 6 a 24 meses de idade (CARDOSO *et al.*, 2003; BERNSTEIN, 2007; DEY *et al.*, 2009). Nas crianças maiores de 24 meses de idade, foi observado um índice menor de infecção, o que reforça alguns estudos realizados que apontam a imunidade adquirida após os dois anos de vida, devido ao fato de que grande parte das crianças nessa faixa etária já tenha tido contato com o agente (VELÁSZQUEZ *et al.*, 2000; JIANG; GENTSCH; GLASS, 2002).

## 2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DOS RVA

As manifestações clínicas das infecções causadas pelo RVA sozinhas não são suficientes para permitir o diagnóstico, já que os sintomas da gastroenterite são similares aos causados por outros patógenos; há, portanto, a necessidade de uma confirmação laboratorial (YOLKEN; WILDE, 1994). O diagnóstico laboratorial nas infecções causadas pelos RVA se torna uma ferramenta importante, pois orienta a conduta médica, minimizando o uso da antibioticoterapia. Já nas notificações epidemiológicas, permite a identificação correta do agente etiológico, possibilitando que a vigilância epidemiológica tome medidas eficazes de controle precocemente (CARRARO *et al.*, 2008). A coleta do espécime fecal nos primeiros dois a cinco dias do início dos sintomas é ideal para a detecção do vírus, pois nesse período ocorre maior excreção viral (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001).

A microscopia eletrônica (ME) é um procedimento de rápida execução e alta especificidade, sendo utilizado até hoje; porém, o uso em larga escala se torna inviável devido ao alto custo do equipamento, sendo o seu uso restrito a alguns centros de pesquisas. Pesquisas utilizam a ME, como "padrão-ouro", sendo indicada para avaliar

resultados discrepantes de outras metodologias (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001; ESTES *et al.*, 2007).

A cultura celular utiliza as linhagens celulares MA104 (células de rim de macaco) e a CaCo-2 (células de carcinoma de cólon humano) (ALMEIDA; HALL, 1978; SATO *et al.*, 1981; RODRIGUES *et al.*, 2004). Porém a sua utilização para diagnóstico não é recomendada, pois a propagação do vírus é muito lenta e difícil, sendo seu uso importante para pesquisas (PURDHAM *et al.*, 1975; SANTOS, 2002).

Os métodos mais utilizados baseiam-se na detecção de antígenos virais, dentre estes o ensaio imunoenzimático (EIE) que emprega anticorpos monoclonais ou policlonais dirigidos à VP6, proteína que constitui o capsídeo interno, comum aos RVA. Existem diversos kits disponíveis no mercado, de fácil execução, com elevada sensibilidade e que permite testar várias amostras ao mesmo tempo, porém podem apresentar custos mais elevados, o que pode limitar o seu uso em laboratórios de pequeno porte e em países em desenvolvimento (BEARDS *et al.*, 1984; FLEWET *et al.*, 1989; LINHARES, *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007). Outro método que se baseia na detecção viral é a aglutinação em látex (AL), uma técnica rápida, prática e de baixo custo, que consiste na detecção de antígenos de RVA em suspensão fecal, empregando partículas de látex sensibilizadas com anticorpos específicos para a proteína VP6 dos RVA (BRANDT *et al.*, 1987). Inúmeros kits também estão disponíveis no mercado para essa metodologia, seu uso é recomendado aos pequenos laboratórios e, sob condições adequadas, aos consultórios médicos. Devido à grande variedade de marcas, frequentemente pesquisas são realizadas para avaliar a acurácia e a aplicação prática desses testes (LIPSON *et al.*, 1990; STEELE *et al.*, 1994; FERREIRA *et al.*, 2006).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) é utilizada para detecção e caracterização do genoma dos RV. Possui uma boa sensibilidade e alta especificidade, além de permitir a identificação de RV pertencentes a outros grupos e infecções mistas que possam estar presentes no indivíduo. Consiste primeiro na obtenção do RNA viral, por meio de métodos de extração, seguido pela sua aplicação em um gel de poliacrilamida, o qual é submetido a uma corrente constante, em que ocorre a migração dos 11 segmentos pela diferença entre seus pesos moleculares (HERRING *et al.*, 1982; KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001; SANTOS, 2002).



Além dos métodos acima citados, com a introdução da biologia molecular, outras metodologias surgiram, entre elas a hibridação com sondas marcadas, os isótopos radioativos, a genotipagem por microarranjos e a transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (LOVMAR *et al.*, 2003; LINHARES *et al.*, 2005). A RT-PCR é um método que possui alta sensibilidade e especificidade, sendo utilizada atualmente em pesquisas, para classificar os diversos genótipos de RVA existentes. Com base na amplificação enzimática dos genes das proteínas VP4 (tipos P) e VP7 (tipos G) e com a utilização de iniciadores consensuais específicos (GOUVEA *et al.*, 1990; WILDE *et al.*, 1991; GENTSCH *et al.*, 1992; DAS *et al.*, 1994; GUNSON *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2007). Atualmente têm sido empregada a técnica de RT-PCR em tempo real, no qual estudos mostraram ser mais sensível e rápida do que a técnica convencional de RT-PCR (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002; KANG *et al.*, 2004; ZENG *et al.*, 2008; NORDGREN *et al.*, 2010).

## 2.7 TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA INFECÇÃO POR RVA

Não existe tratamento específico para a doença causada pelos RVA. O tratamento é o mesmo instituído para as doenças diarreicas agudas, uma dieta habitual deve ser mantida, consistindo na reposição de fluidos e eletrólitos perdidos pelos vômitos e pela diarreia, para evitar as complicações que podem surgir como a desidratação grave e os distúrbios eletrolíticos (BEZERRA *et al.*, 1992). O uso de antimicrobianos são contraindicados, assim como os antidiarreicos, pois retardam a eliminação das toxinas virais (LINHARES, 1997).

Por meio das técnicas de cultivos celulares *in vitro*, surgiram as primeiras investigações para o desenvolvimento de uma vacina contra os RVA. Três candidatas à vacina foram preparadas e submetidas à avaliação em campo, a RIT 4237 e WC3, derivadas de uma fonte bovina e ambas sorotipo G6 e a MMU-18006, cepa de RV de macaco Rhesus sorotipo G3, associada a três outras cepas de origem humana, com especificidade para G1, G2 e G3, de tal forma que a vacina tetravalente expressava rearranjo de origem símia e humana (BERNSTEIN *et al.*,

1990; PÉREZ-SCHAEEL *et al.*, 1990; VESIKARI *et al.*, 1985; KAPIKIAN; CHANOCK, 1996; FOSTER; WAGSTAFF, 1998; OLIVEIRA; LINHARES, 1999; KAPIKIAN, 2001). Com o nome comercial de Rotashield™ (RRV-TV - rhesus-human, reassortant, tetravalent rotavírus vaccine), produzida pelo laboratório Wyeth (EUA), foi licenciada em agosto de 1998, a primeira vacina para uso humano nos Estados Unidos. Após licenciamento e uso em larga escala nos Estados Unidos, em 1999, com mais de um milhão de doses já aplicadas, foram detectados casos de intussuscepção (invaginação intestinal), considerada um evento adverso raro, que pode ser fatal entre os indivíduos que tinham sido vacinados (MURPHY *et al.*, 2001). O CDC (Centers for Disease Control and Prevention) recomendou então a suspensão da vacina, e neste mesmo ano ela foi retirada do mercado (LINHARES; BRESEE, 2000; MURPHY *et al.*, 2003; SIMONSEN *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Entre as vacinas de caráter polivalente, estão a derivada da amostra WC3, com vírus atenuado de administração oral, rearranjo genético humano-bovino, pentavalente e com especificidades antigênicas G1, G2, G3, G4 e P1A[8], chamada de Rotateq™, da Merck Research Laboratories, Pensilvânia, licenciada em fevereiro de 2006, nos Estados Unidos, atualmente em circulação em 90 países (HEATON; CIARLET, 2007; CIARLET; SCHÖDEL, 2009). Em testes realizados, esta vacina apresentou elevada proteção contra as formas graves de diarreia, isenção de reações adversas e rara excreção do vírus vacinal (HEATON, 2004; GLASS; PARASHAR, 2006; VESIKARI *et al.*, 2006; MATTHIJNSSENS *et al.*, 2010). E a vacina RIX4414 de origem humana, com vírus atenuado, monovalente, com especificidade P1A[8] G1, desenvolvida com uma cepa de RV (cepa 89-12) isolada de uma criança em Cincinnati, Ohio (EUA), após passagens em cultivos celulares e clonagem (BERNSTEIN *et al.*, 1998). Ela foi licenciada em 2000, com o nome comercial de Rotarix™, produzida pela Glaxo SmithKline Biologicals, Bélgica. Em março de 2006, a Rotarix™ foi incluída no Calendário Básico de Imunizações Brasileiro, em esquema de duas doses, por via oral, aos 2 e 4 meses de idade.

Muitos estudos estão sendo realizados para avaliar o impacto da introdução da vacinação em nosso país (SALINAS *et al.*, 2005; RUIZ-PALACIUS *et al.*, 2006; DE OLIVEIRA *et al.*, 2008). Um estudo realizado por ARAÚJO *et al.*, (2007), demonstrou que a vacina foi bem tolerada, e não revelou nenhum evento adverso grave, sendo altamente eficaz contra infecções graves causadas por RVA de sorotipo G9, o que confere à vacina proteção cruzada.

Recentemente a Rotarix™ foi introduzida em diversos países como: Austrália, Áustria, Bélgica, Bolívia, Colômbia, Equador, Honduras, México, Peru, El Salvador, Luxemburgo, África do Sul, Estados Unidos e Venezuela (DENNEHY *et al.*, 2008; CUNLIFFE *et al.*, 2009; VESIKARI *et al.*, 2010).

Ainda, entre candidatas à vacina de origem humana, estão a RV3, 116E e I321. A RV3 com especificidade antigênica P[6] G3, isoladas de recém-nascidos assintomáticos em berçários na Austrália. A 116E e I321, isoladas de recém-nascidos na Índia, a primeira pertencente ao genótipo P[11] G10 e a segunda, com especificidade para P[11] G9 (GLASS *et al.*, 2005; BHANDARI *et al.*, 2006; BHANDARI *et al.*, 2009, RIPPINGER; PATTON; MCDONALD, 2010).

Outras estratégias para o desenvolvimento de novas vacinas reunindo preparações virais não infecciosas estão sendo exploradas, por meio de procedimentos da biologia molecular, e designadas de "vacinas do futuro". Essas preparações compreendem os vírus destituído de RNA (partícula defectiva), proteínas recombinantes, peptídeos sintéticos e vacinas de DNA integrado a um plasmídeo (HERMANN *et al.*, 1996; IJAZ *et al.*, 1998; NGUYEN *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2010).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Esta pesquisa foi de caráter retrospectivo, com estudo caracterizado como descritivo e de corte transversal, pois analisou amostras de fezes armazenadas de pacientes com gastroenterite aguda, ambulatoriais ou hospitalizados no HC-UFPR que foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia do HC-UFPR para pesquisa de RVA coletadas no período de abril de 2001 a dezembro de 2008, portanto tratou-se de uma amostragem de conveniência. É uma pesquisa aplicada, pois visa implantar o método de EGPA e RT-PCR para diagnóstico laboratorial do RVA no HC-UFPR, bem como investigar características clínico-epidemiológicas desse vírus.

#### 3.2 AMOSTRAS

O setor de Virologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) analisa anualmente em torno de 150 amostras de fezes para a pesquisa de RVA. Este material foi coletado dos pacientes hospitalizados nas unidades de pediatria (Serviço de Emergência, Unidade de Terapia Intensiva e Infectologia), de pacientes ambulatoriais da pediatria e de pacientes atendidos na unidade de Transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH). Alíquotas de todo o material analisado foram armazenadas em temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , desde 2001, para posterior análise por técnicas de biologia molecular.

Neste estudo foram avaliadas, retrospectivamente, em sua totalidade, 1.140 amostras de fezes, inicialmente foram testadas quanto à presença de RVA pelos testes de triagem, aglutinação em partículas de látex (AL), (Kit Virotest Rota-Omega Diagnostics e Kit Rotascreen-Microgen Bioproducts) e (ou) ensaio imunoenzimático (EIE), (Kit EIARA-Biomanguinhos, Kit Rotascreen II - Microgen Bioproducts). Alíquotas do material analisado foram separadas em frascos livres de RNAses e DNAses e armazenadas em temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , para análise posterior por eletroforese em

gel de poliacrilamida (EGPA) e reação em cadeia da polimerase precedida da transcriptase reversa (RT-PCR).

Todos os prontuários dos pacientes submetidos a RT-PCR foram revisados e os dados pesquisados foram anotados em formulário desenvolvido para o presente estudo (Apêndice 6).

### 3.2.1 Critérios de inclusão

Amostras de fezes coletadas de pacientes internados ou ambulatoriais (Serviço de Emergência, Unidade de Terapia Intensiva, Infectologia, pediatria e TCTH) atendidos no HC-UFPR, armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  que foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia do HC-UFPR para pesquisa de RVA durante os anos de 2001 a 2008.

### 3.2.2 Critérios de exclusão

Amostras armazenadas em temperatura ambiente ou coletadas em frascos inadequados, ou seja, frascos reutilizados ou com meio de transporte para pesquisa de bactérias.

## 3.3 APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

Os procedimentos que envolvem a utilização do banco de amostras clínicas do laboratório de virologia para a pesquisa de RVA em amostras humanas de fezes têm a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do HC-UFPR, sob número de registro 4441.023/2002-04.

### 3.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

As amostras foram processadas de acordo com as instruções fornecidas pelos fabricantes para os testes de triagem, EIE e (ou) AL. Para os testes de EGPA e RT-PCR, inicialmente, foram preparadas suspensões fecais a 10% (p/v) para as fezes semisólidas ou 50% (v/v) para as fezes líquidas em tampão Tris/HCL (Tris 0,01M (Vetec)/CaCl<sub>2</sub> 0,015M (Merck) pH 7.2) em tubo de centrifuga. As suspensões foram homogeneizadas e centrifugadas (Marca Sigma 2 K15) por 10 minutos a 2000rpm, em temperatura de 4°C. Alíquotas de 200µL da suspensão fecal foram separadas em tubos tipo eppendorf para a extração do RNA viral.

### 3.5 DETECÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL

#### 3.5.1 Aglutinação em partículas de látex (AL)

Consiste na detecção de antígenos de RVA em suspensão fecal, empregando partículas de látex sensibilizadas com anticorpos específicos para RVA. O preparo foi realizado com 10% de suspensão de amostra fecal adicionando 0,1 mL/0,1g de amostra a 1mL de tampão fosfato/EDTA em um tubo com tampa. Esta foi colocada em centrífuga a 2000rpm por 10 minutos. Em seguida, 50µL do sobrenadante foi adicionado no primeiro círculo (círculo teste) juntamente com uma gota do reagente-teste (látex). No segundo círculo, também foi adicionado 50µL do sobrenadante juntamente com uma gota do reagente controle; estas misturas são homogeneizadas cuidadosamente e mantidas sob agitação com movimentos rotacionais lentos e uniformes por 2 minutos, na sequência são examinados sob uma fonte de luz forte para a observação da formação de aglutinação. O controle positivo deve produzir um resultado positivo (aglutinação) dentro de 2 minutos. Como controle negativo foi usado o tampão do processamento das amostras. Os controles que não forneceram os resultados esperados para o teste foram considerados inválidos.

### 3.5.2 Ensaio imunoenzimático (EIE)

Este ensaio consiste no método "sanduíche", em que os antígenos foram capturados na fase sólida por soros hiperimunes de cabras e a detecção dos antígenos foi evidenciada por soros hiperimunes de cobaias. Em seguida, foi adicionado um anticorpo conjugado Ig de cobaia marcado com a enzima peroxidase. Para revelação foi adicionado tetrametilbenzidina (TMB), que sob a ação da peroxidase, deu origem a um composto de coloração azul que se tornou amarelo com a adição de ácido sulfúrico. A reação foi lida em aparelho fotocolométrico, em comprimento de onda de 450nm. O teste foi realizado de acordo com as instruções fornecidas pelos fabricantes e os "kits" utilizados variaram durante os anos estudados de acordo com a disponibilidade da instituição.

## 3.6 DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL

### 3.6.1 Controle positivo e negativo

Para a técnica de EGPA e RT-PCR/*nested* foi utilizada como controle negativo água ultrapura. Para o controle positivo, foram usadas sobrenadantes de cultura celular da amostra padrão, a cepa SiRV-A/SA11, de RV de macaco, doadas gentilmente pelo Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite, pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro. Foram utilizados controles positivo e negativo em todas os ensaios.

### 3.6.2 Extração do RNA viral

Para a extração do RNA viral foi utilizado o método de Boom *et al.* (1990), com algumas modificações. Alíquotas de 200µL da suspensão fecal foram

separadas em tubos tipo eppendorf e em seguida foram adicionados 800µL de tampão L6 (Isotiocianato de guanidina (Invitrogen)/0,1 M Tris/HCL (USB) pH 6,4/ 0,2M EDTA (Reagen) pH 8.0/Triton X-100 (Agros Organics), homogeneizadas e incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente, após foram adicionados 10µL de sílica (Sigma S5631). A mistura foi homogeneizada e incubada sob agitação durante 30 minutos em agitador orbital (Cientec CT-145) em temperatura ambiente. Posteriormente, foi centrifugada a 14.000 x rpm por 30 segundos à temperatura de 4°C, descartado o sobrenadante em frasco apropriado contendo NaOH 10M, em seguida foram adicionados 500µL de tampão L2 (Isotiocianato de guanidina/0,1M Tris/HCL pH 6,4) seguido de homogeneização e centrifugado a 14.000 x rpm por 30 segundos, à temperatura de 4°C, o sobrenadante foi novamente descartado. Ao precipitado foram adicionados 500µL de etanol 70% mantido à temperatura de -20°C, homogeneizado e centrifugado a 14.000 x rpm por 30 segundos, à temperatura de 4°C, descartado o sobrenadante. Em seguida foram adicionados 500µL de acetona PA, mantida à temperatura de -20°C, homogeneizado e centrifugado a 14.000 x rpm por 30 segundos, à temperatura de 4°C, e descartado a seguir todo o sobrenadante. Após esta fase, os tubos foram colocados abertos em termobloco à temperatura de 56°C por 15 minutos para evaporação da acetona. Expirado o tempo, foram adicionados 50µL de água ultrapura à mistura, homogeneizadas e incubadas novamente em termobloco por 15 minutos a 56°C, com as tampas fechadas dos tubos. Após, homogeneizadas e centrifugadas a 14.000 x rpm por 3 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo tipo eppendorf novo, livre de RNAses e DNases e mantido à -70°C até a sua utilização.

### 3.6.3 Análise eletroforética

Os segmentos genômicos de RNA dos RVA foram analisados pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, descrita por Laemmli, (1970), modificada por Pereira *et al.* (1983). A corrida foi realizada em uma cuba horizontal (BIORAD) utilizando um gel composto por duas fases: uma fase concentradora (gel superior concentração de 3,5% de acrilamida) e uma fase separadora (gel inferior, a uma



concentração de 7,5% de acrilamida) (ANEXO 1.4.3). Para a corrida foi adicionada tampão Tris (Merck)/Glicina (Reagen) e após a aplicação da amostra, o gel foi submetido a uma corrente constante de 200V (Fonte Sigma), por aproximadamente 2 horas. A coloração foi realizada segundo protocolo descrito por Herring *et al.* (1982) em anexo 1.4.4. Os géis foram fotografados em um sistema de foto e documentação (Vilber Lourmat) e as imagens armazenadas para documentação, após os géis foram descartados em recipientes apropriados.

#### 3.6.4 Transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

A obtenção do cDNA foi realizada com uma solução contendo 6µL do RNAf.d. extraído, 1µL de cada oligonucleotídeo específico (20 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores consensuais 4con3 e 4con2 (GENTSCH *et al.*, 1992), utilizados para a amplificação de um fragmento de 876 pb do gene da VP4 (P), ou 9con1 e 9con2 (DAS *et al.*, 1994) que amplificaram um fragmento de 904 pb do gene da VP7 (G) e 4µL de dNTPs (0,5 mM, dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Esta mistura foi incubada a 65°C por 5 minutos e transferidas rapidamente para o gelo. Para cada amostra foi adicionada 8µL de solução constituída de 2,5 µL de tampão para PCR (5x), 2µL de DTT (0,1M), 1µL de RNase OUT (40U/µL), 0,5µL de Superscript™II (Invitrogen™, Life Technologies, EUA) e 0,5µL de H<sub>2</sub>O ultra-pura e incubada em termobloco (1202 SKS Bio- Medical Instruments LTD) a 42°C durante 50 minutos e em seguida a 70°C por 15 minutos.

A reação de amplificação por RT-PCR seguiu a descrição de Gouvea *et al.* (1990). As reações de RT-PCR foram realizadas em um volume final de 25µL, contendo 5µL de cDNA, 2,5µL de tampão para PCR (10x), 4µL de dNTPs (0,5mM, dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Applied Biosystems), 1µL de Cloreto de Magnésio 50mM (Invitrogen), 1µL de cada iniciador 9con1/9con2 ou 4con2/4con3, e 0,25µL da enzima Platinum® Taq DNA polimerase (1,25 U) (Invitrogen™, Life Technologies, EUA). A amplificação foi realizada em termociclador (Techne e Eppendorf) na seguinte sequência: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 3 min, 40 ciclos de 94°C por 45 s, 45°C por 45 s e 72°C por 1 min, seguidos por uma etapa de extensão final a 72°C por 10 min (APÊNDICE 2 E 4).

### 3.6.5 Genotipagem por *nested* RT-PCR *multiplex*

Foram realizados gel de agarose em todas as amostras após o primeiro PCR. Para a *nested*-RT-PCR *multiplex*, primeiramente foi utilizada alíquotas de 1µL das diluições do primeiro PCR, após a visualização em gel de agarose das bandas. Quando as bandas apresentavam excesso de material ou bandas duplas, estas amostras foram diluídas a partir de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000, 1:100.000 até 1:1.000.000 do produto da PCR e a *nested*-RT-PCR *multiplex* foi repetida. O *mix* para a *nested*-RT-PCR constituiu de 4µL de dNTPs (0,5mM, dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Applied Biosystems), 2,5µL de tampão para PCR (10x), 1µL de Cloreto de Magnésio 50mM (Invitrogen), 0,25µL da enzima Platinum® Taq DNA polimerase, 1,25U (Invitrogen™, Life Technologies, EUA), 1µL de iniciador consensual tipo G, 9con1, com 1µL dos iniciadores específicos 9T1-1 (G1-humano), 9T1-2 (G2 - humano), 9T-3P (G3 - humano), 9T-4 (G4 - humano), FT5 (G5 - animal) denominado de pool A; HT8 (G8 - animal), 9T-9B (G9 - humano) e ET10 (G10 - animal) denominado de pool B; DT6 (G6 - animal) e BT11 (G11 - animal) denominado de pool C (DAS *et al.*, 1994; GOUVEA *et al.*, 1994b) (Quadro 1). Para os genótipo-específicos empregados para a determinação dos genótipos P foram utilizados 1µL de iniciador consensual tipo P, 4con3, juntamente com 1µL dos iniciadores específicos 2T-1 (P[4]), 3T-1 (P[6]), 1T-1 (P[8]) e 4T-1 (P[9]) denominado de pool A, o iniciador pNCDV, específico para o genótipo P[1] foi utilizado juntamente com o iniciador consensual 4con2 (GENTSCH *et al.*, 1992; GOUVEA *et al.*, 1994c), totalizando um volume final de 25µL. O processo de amplificação foi realizado em termociclador (Techne e Eppendorf) e consistiu de um ciclo inicial a 94°C por 3 min; 40 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 2 min e 72°C por 1 min; seguidos de uma etapa de extensão final a 72°C por 10 min (Quadro 2).(APÊNDICE 3 E 5).

GENÓTIPO	INICIADOR E POLARIDADE	SEQUÊNCIA 5'-3'	POSIÇÃO (nt)	PRODUTO (pb)	PROTÓTIPO DE ORIGEM
G (comum) <sup>(1)</sup>	<i>9con1 (+)</i>	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG	37-56		HuRV-A / Wa <sup>2</sup>
G (comum) <sup>(1)</sup>	<i>9con2 (-)</i>	GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA	941-922	904	HuRV-A / Wa <sup>2</sup>
G1 (humano)	<i>9T1-1 (-)</i>	TCT TGT CAA AGC AAA TAA TG	195-176	158	HuRV-A / S2 <sup>2</sup>
G2 (humano)	<i>9T1-2 (-)</i>	GTT AGA AAT GAT TCT CCA CT	281-262	244	HuRV-A / 107E1B <sup>2</sup>
G3 (humano)	<i>9T-3P (-)</i>	GTC CAG TTG CAG TGT TAG C	503-484	466	HuRV-A / 107E1B <sup>2</sup>
G4 (humano)	<i>9T-4 (-)</i>	GGG TCG ATG GAA AAT TCT	440-423	403	HuRV-A / STE <sup>2</sup>
G5 (animal)	<i>FT-5 (-)</i>	CAT GTA CTC GTT GTT ACG TC	779-760	742	PoRV-A / OSU <sup>4</sup>
G6 (animal)	<i>DT6 (-)</i>	CTA GTT CCT GTG TAG AAT C	499-481	500	BoRV-AUK <sup>4</sup>
G8 (animal)	<i>HT8 (-)</i>	CGG TTC CGC ATT AGA CAC	273-256	274	HuRV-A / B37 <sup>4</sup>
G9 (humano)	<i>9T-9B (-)</i>	TAT AAA GTC CAT TGC AC	147-131	110	HuRV-A / 116E <sup>2</sup>
G10 (animal)	<i>ET10 (-)</i>	TTC AGC CGT TGC GAC TTC	714-697	715	HuRV-A / B223 <sup>4</sup>
G11 (animal)	<i>BT11 (-)</i>	GTC ATC AGC AAT CTG AGT TGC	336-316	337	PoRV-A / YM <sup>4</sup>

QUADRO 1 - SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA A RT-PCR E A GENOTIPAGEM DE ROTAVÍRUS PARA A PROTEÍNA VP7

FONTE: (2) Das *et al.* (1994); (4) Gouvea *et al.* (1994c)

(1) amplificam todos os genótipos.

GENÓTIPO	INICIADOR E POLARIDADE	SEQUÊNCIA 5'-3'	POSIÇÃO (nt)	PRODUTO (pb)	PROTÓTIPO DE ORIGEM
P <sup>(1)</sup>	<i>4con2 (-)</i>	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	887-868	876	HuRV-A / KU <sup>1</sup>
P <sup>(1)</sup>	<i>4con3 (+)</i>	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	11-32		HuRV-A / KU <sup>1</sup>
P[1]	<i>pNCDV (+)</i>	TCT TGT CAA AGC AAA TAA TG	269-289	622	BoRV-A / NCDV <sup>3</sup>
P[4]	<i>2T-1 (-)</i>	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	494-474	483	HuRV-A / RV5 <sup>1</sup>
P[6]	<i>3T-1 (-)</i>	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	278-259	267	HuRV-A / 1076 <sup>1</sup>
P[8]	<i>1T-1 (-)</i>	TCT ACT TGG ATA ACG TGC	356-339	345	HuRV-A / KU <sup>1</sup>
P[9]	<i>4T-1 (-)</i>	TGA GAC ATG CAA TTG GAC	402-385	391	HuRV-A / K8 <sup>1</sup>

QUADRO 2 - SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA A RT-PCR E A GENOTIPAGEM DE ROTAVÍRUS PARA A PROTEÍNA VP4

FONTE: (1) Gentsch *et al.* (1992); (3) Gouvea *et al.* (1994b)

(1) Amplificam todos os genótipos.

### 3.6.6 Análise dos produtos amplificados

Após cada reação de RT-PCR e da *nested*-RT-PCR *multiplex*, 5µL dos produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo 0,5g/mL de brometo de etídeo. O corante utilizado na amostra foi azul de bromofenol e o padrão de massa molecular foi de 1Kb (1Kb Plus DNA Ladder – Invitrogen). O tampão de corrida utilizado foi o TBE pH 8,4 (89mM Tris-Borato, 2mM EDTA (Reagen/Merck). O gel foi submetido a uma corrente constante de 100V por aproximadamente 30 minutos e visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em aparelho para foto e documentação (Vilber Lourmart) para posterior análise. O genótipo de cada amostra testada foi definido pelo tamanho do fragmento gerado analisado pelo programa E-capt. As amostras que apresentaram duas ou mais

bandas foram repetidas, utilizando um único iniciador específico, para descartar contaminação ou revelar possível coinfeção.

### 3.7 INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

Para coleta dos dados clínicos e epidemiológicos, foram revisados os prontuários de todos os pacientes com resultados positivos para RVA. Os dados encontrados foram anotados em formulário próprio desenvolvido para o presente estudo (Apêndice 6).

A desidratação foi classificada de acordo com o preconizado pela OMS. Foi considerada como hipernatremia quando o valor do sódio foi  $\geq 150\text{mEq/L}$  (BARBOSA; SZTAJNBOK, 1999).

Foram consideradas como portadores de infecção nosocomial os pacientes que apresentaram diarreia após 72 horas de internamento, levando-se em conta o período inicial de incubação do RVA de 24 a 72 horas, como está descrito na literatura (LINHARES *et al.*, 2005).

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais foram digitados em tabela Excel<sup>TM</sup> e submetidos às análises descritivas para todas as as variáveis. Os dados foram compilados e analisados utilizando o *software* JMP, versão 5.2.1. As características operacionais dos testes de detecção de antígenos, sensibilidade, especificidade, acurácia, valores preditivos e razão de probabilidades foram calculados utilizando métodos exatos binomiais e considerando como padrão-ouro o teste de EGPA. A concordância entre os testes laboratoriais foi analisada utilizando o coeficiente de Kappa: valores acima de 0,75 foram considerados com alta concordância, valores entre 0,40 e 0,75 com moderada concordância e valores inferiores a 0,40 com baixa concordância. A diferença entre os grupos foi analisada utilizando-se os testes de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando apropriado.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Entre janeiro de 2001 a dezembro de 2008, o laboratório de virologia do HC-UFPR recebeu 1140 amostras de fezes para a detecção de RVA. Estas eram provenientes de pacientes hospitalizados nas unidades de UTI pediátrica, Emergência pediátrica, Infectopediatria, Transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) e de pacientes atendido no ambulatório de Pediatria.

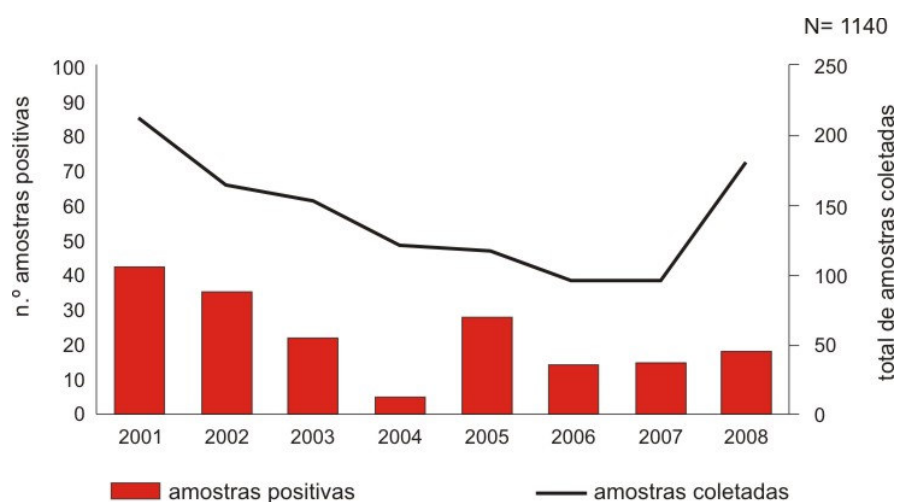


FIGURA 4 - TOTAL DE AMOSTRAS COLETADAS E POSITIVAS PARA ROTAVÍRUS NAS METODOLOGIAS DE EIE E AL NO PERÍODO DE 2001 A 2008 NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO HC-UFPR  
 FONTE: O autor (2011)

O diagnóstico laboratorial para triagem das amostras foi realizado pelos métodos de ensaio imunoenzimático (EIE) e (ou) aglutinação em partículas de látex (AL). Cento e setenta e nove (179/1140 - 15,7%) amostras foram positivas para RVA nas metodologias de EIE e (ou) AL. A realização da EGPA teve como objetivo a detecção de amostras positivas para RV não-A. Não foi observado perfil eletroforético característico de RV não-A nas amostras analisadas (Tabela 1).

**TABELA 1 - RESULTADO DA ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE FEZES PARA INVESTIGAÇÃO DE RVA NO PERÍODO DE 2001 A 2008 NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO HC-UFPR**

	POSITIVAS	NEGATIVAS	INDETERMINADAS	TOTAL n=1140*
EIE	89 (12,3)	630 (87,3)	03 (0,3)	722*
AL	122 (22,3)	382 (69,8)	43 (7,9)	547*
EGPA	103 (11,5)	794 (88,5)	0	897*

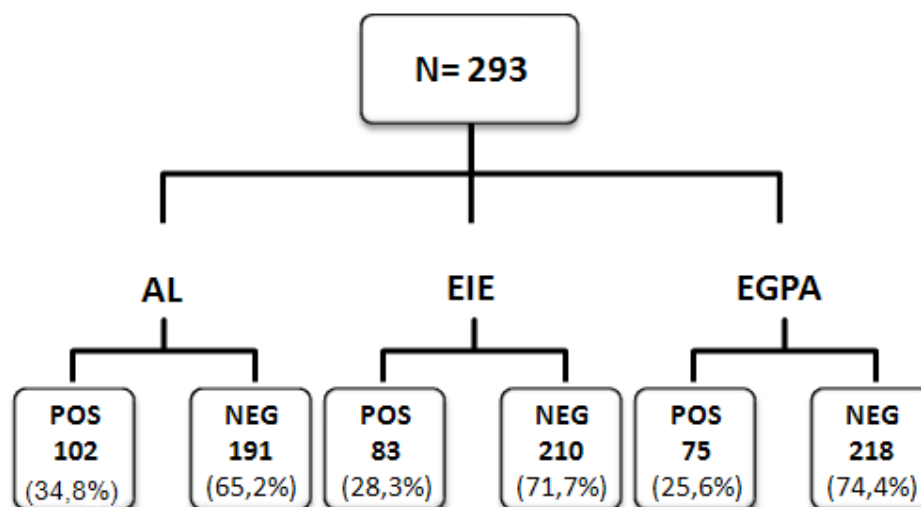
FONTE: O autor (2011)

NOTA: Os dados estão mostrados como número (percentagem), salvo nos casos indicados.

\* Algumas amostras foram avaliadas somente por uma metodologia

#### 4.1.1 Características operacionais dos testes diagnósticos de detecção de antígenos virais

Com o objetivo de avaliar o desempenho dos testes de detecção de antígenos virais utilizados para o diagnóstico de RVA no período do estudo, um total de 293 amostras foram analisadas pelas metodologias de EIE e AL e pela EGPA. A EGPA foi escolhida como padrão-ouro nessa avaliação por ser uma técnica de boa sensibilidade e alta especificidade (Figura 5).



**FIGURA 5 - RESULTADO DA ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE FEZES PARA INVESTIGAÇÃO DE RVA NAS TRÊS METODOLOGIAS NO PERÍODO DE 2001 A 2008 NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO HC-UFPR**

FONTE: O autor (2011)

Ao comparar os resultados obtidos pelo teste de AL com EGPA, a sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do teste AL foram 82,6%, 81,6%, 81,9%, 60,7% e 93,1%, respectivamente. A avaliação do grau de concordância dos exames analisados encontrou um  $p$  - valor do teste *Kappa* de  $0,57 \pm 0,05$  entre estes dois métodos. Para os resultados entre EGPA e EIE, a sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do teste de EIE encontrados foram 94,6%, 94,4%, 94,5%, 85,5% e 98%. O  $p$ - valor do teste *Kappa* foi de  $0,86 \pm 0,03$  (Figura 6).

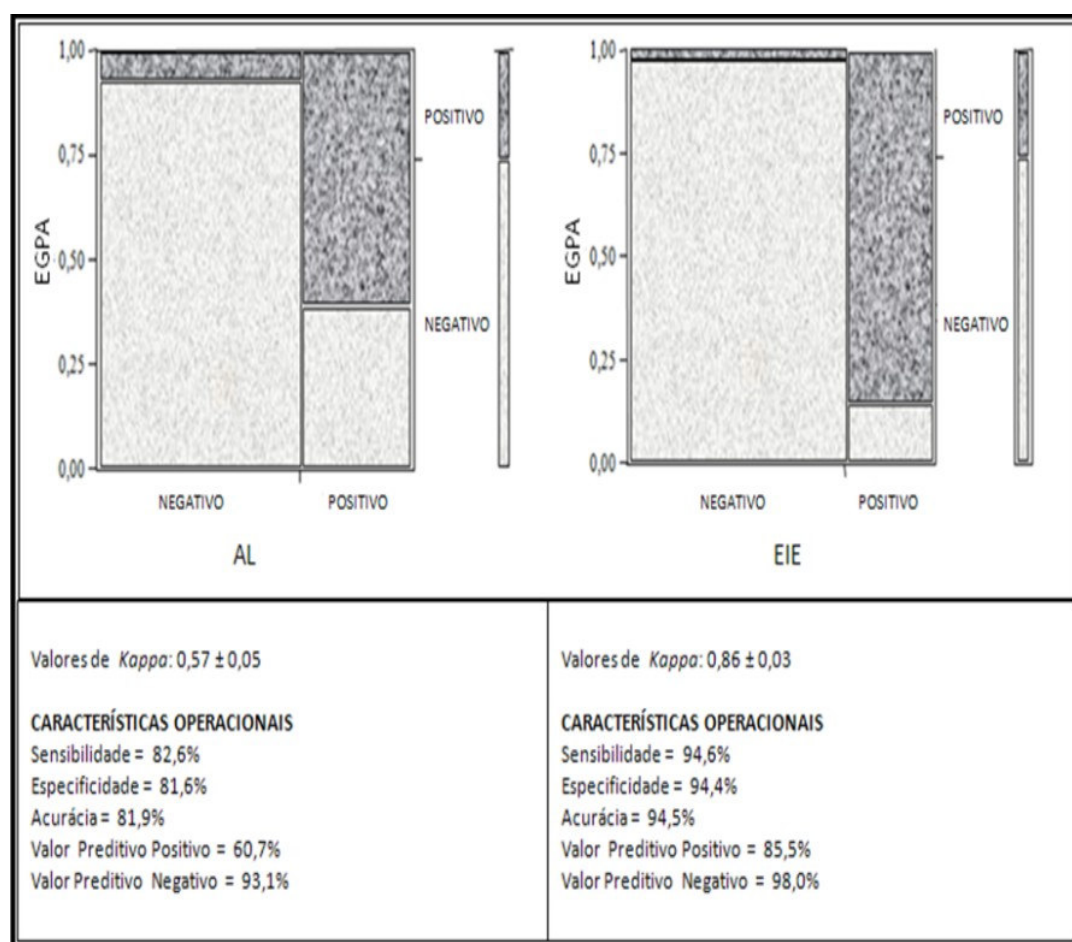


FIGURA 6 - DIAGNÓSTICO DE ROTAVÍRUS – TABELA DE CONTINGÊNCIA E CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DOS TESTES DE DETECÇÃO DE ANTÍGENOS  
 FONTE: O autor (2011)

#### 4.1.2 Variabilidade genética dos RVA

Para a caracterização molecular dos RVA, realizou-se um *nested* RT-PCR *multiplex* para o qual foram selecionadas 80 amostras (71 de pacientes que apresentaram padrão de migração na EGPA sugestivo de RVA e nove que apresentaram resultados positivos na detecção de antígenos na metodologia de EIE e AL, porém a EGPA foi negativa). A técnica de EGPA foi realizada de acordo com o descrito em material e métodos, item 3.6. Em todas as corridas foi utilizado o padrão SiRV-A/SA11 como controle positivo (Figura 7).

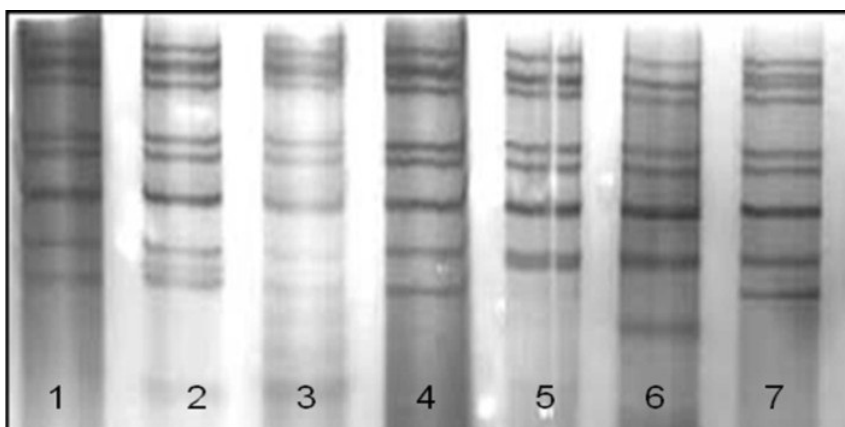


FIGURA 7 - AMOSTRAS DE RVA POSITIVAS REPRESENTATIVAS DO PERÍODO ESTUDADO (2001 A 2008). ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (EGPA)

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Colunas 1 a 7 amostras positivas para RVA.

As técnicas de caracterização molecular, *nested* RT-PCR *multiplex*, foram realizadas de acordo com o descrito em material e métodos, itens 3.6.2, 3.6.4 e 3.6.5, utilizando protocolos específicos para amplificar os genes correspondentes às proteínas VP7 (genótipo G) (Apêndices 1, 2 e 3) e VP4 (genótipo P) (Apêndices 1, 4 e 5). Foi utilizada na RT-PCR como controle positivo a cepa padrão SiRV-A/SA11 e como controle negativo a água, para monitorar possíveis contaminações (Figura 8). Todas as 80 amostras foram submetidas ao segundo PCR *multiplex*, mesmo aquelas em que as bandas não foram visualizadas no primeiro PCR. Setenta e duas (72/80 - 90%) amostras foram positivas para RVA, oito (8/80 - 10%) tiveram resultados negativos



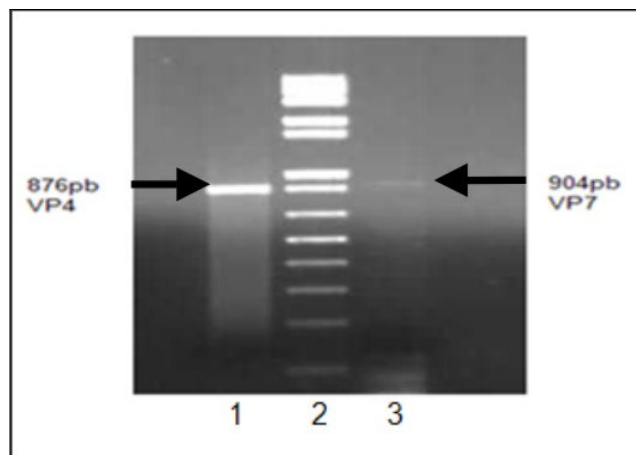


FIGURA 8 - GEL DE AGAROSE A 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO O RESULTADO DA REAÇÃO DE RT-PCR ONDE SE VISUALIZA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM PARA AS PROTEÍNAS VP4 E VP7 DO CONTROLE POSITIVO SiRV-A/SA11

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Linha 1: VP4 com 876 pb; Linha 2: Padrão de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, Life Technologies); Linha 3: VP7 com 904 pb.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PARA OS GENÓTIPOS G E P

### 4.2.1 Detecção dos genótipos G (VP7)

A técnica de *nested RT-PCR multiplex* foi eficiente na amplificação de 57 (57/72 - 79,1%) das amostras positivas de fezes analisadas para o tipo G (VP7) (Figura 9). Os resultados obtidos estão representados na tabela 2.

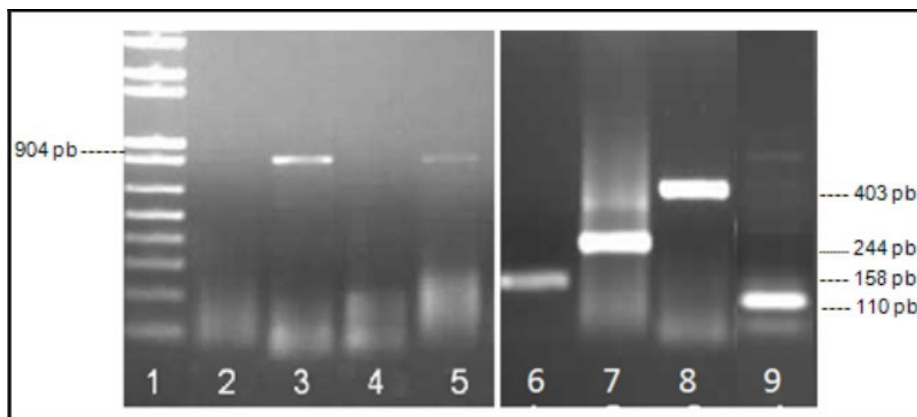


FIGURA 9 - GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO O TESTE DA *nested* RT-PCR *multiplex* DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA O TIPO G (VP7)

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Linha 1: 1Kb *Plus DNA Ladder*; Linha 2: Controle negativo; Linha 3,4 e 5: Produto do primeiro PCR (904pb); Linha 6: Produto da *nested* RT-PCR: Genótipo G1 (158pb); Linha 7:Genótipo G2 (244pb), Linha 8:Genótipo G4 (403pb), Linha 9:Genótipo G9 (110pb).

TABELA 2 - RESULTADO DA ANÁLISE DOS GENÓTIPOS PARA A PROTEÍNA VP7 (TIPO G) NAS AMOSTRAS DE FEZES PARA RVA NO PERÍODO DE 2001 A 2008 NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO HC-UFPR

	G1	G2	G4	G9	TOTAL %
2001	10 (76,9)	0	3 (23,1)	0	13 (22,8)
2002	0	0	20 (80,0)	5 (20,0)	25 (43,9)
2003	8 (100,0)	0	0	0	8 (14,0)
2004	0	0	0	1 (100,0)	1 (1,8)
2005	0	0	0	4 (100,0)	4 (7,0)
2006	0	3 (75,0)	0	1(25,0)	4 (7,0)
2008	0	2 (100,0)	0	0	2 (3,5)
	18 (31,6)	5 (8,8)	23 (40,3)	11 (19,3)	57 (79,1)

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Os dados estão mostrados como número (percentagem), salvo nos casos indicados.

A distribuição de todas as amostras para os genótipos tipo G (VP7) por ano, estão representadas na figura 10.

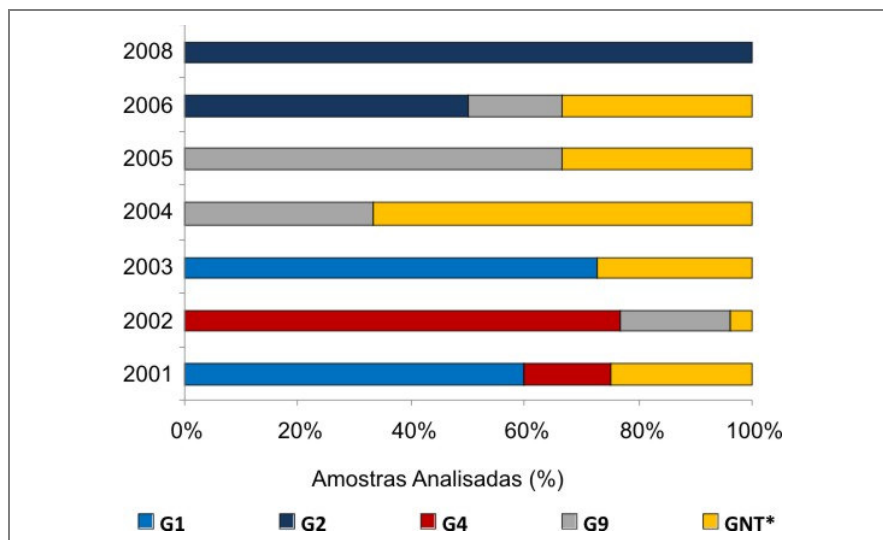


FIGURA 10 - RESULTADO DA DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS TIPO G DE RVA DETECTADOS NAS AMOSTRAS DE FEZES COLETADAS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS EM CURITIBA-PR DURANTE OS ANOS DE 2001 A 2008

FONTE: O autor (2011)

NOTA: GNT\*: amostras não tipadas.

#### 4.2.2 Detecção dos genótipos P (VP4)

Para os genótipos P (VP4) a técnica mostrou-se eficiente na amplificação de 61 (61/72 - 84,7%) amostras de fezes analisadas (Figura 11). Os resultados obtidos estão representados na tabela 3.

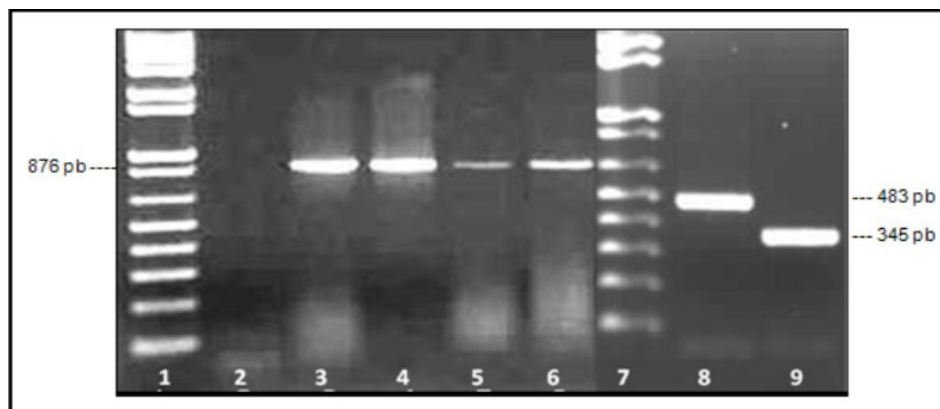


FIGURA 11 - GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO OS RESULTADOS DOS TESTES DA *nested* RT-PCR multiplex DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA O GENÓTIPO P (VP4)

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Linha 1 e 7: *1Kb Plus DNA Ladder*; Linha 2: Controle negativo; Linha 3 a 6: Produto do primeiro PCR (876pb); Linha 8: Produto da *nested* RT-PCR: Genótipo P[4](483pb); Linha 9: Genótipo P[8](345pb).

TABELA 3 - RESULTADO DA ANÁLISE DOS GENÓTIPOS PARA A PROTEÍNA VP4 (TIPO P) NAS AMOSTRAS DE FEZES PARA RVA NO PERÍODO DE 2001 A 2008 NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO HC-UFPR

	P [4]	P [8]	TOTAL %
2001	0	15 (100)	15 (24,6)
2002	0	26 (100)	26 (42,6)
2003	0	8 (100)	8 (13,1)
2004	0	2 (100)	2 (3,3)
2005	0	3 (100)	3 (4,9)
2006	5 (100)	0	5 (8,2)
2008	2 (100)	0	2 (3,3)
	7 (11,5)	54 (88,5)	61 (84,7)

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Os dados estão mostrados como número (percentagem), salvo nos casos indicados.

A distribuição de todas as amostras para o genótipo tipo P (VP4), por ano, estão representadas na figura 12.

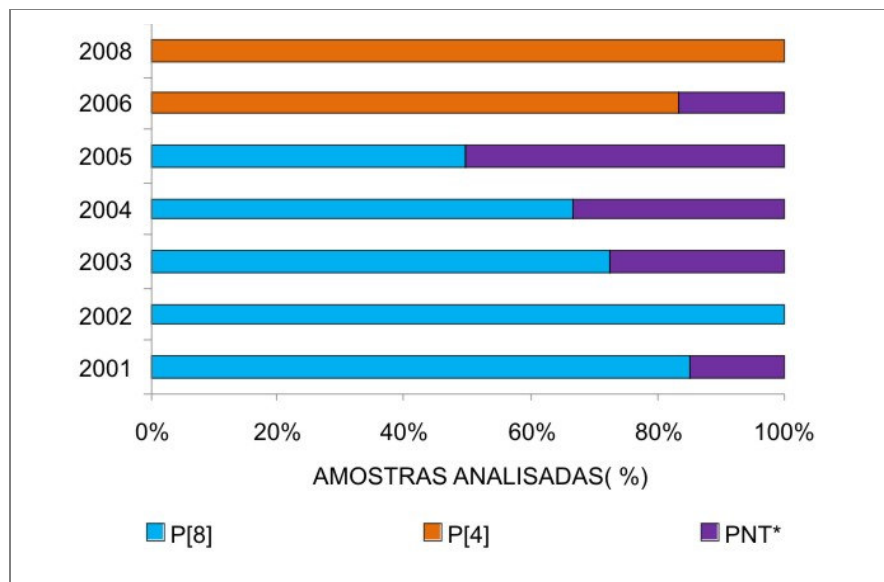


FIGURA 12 - RESULTADO DA DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS TIPO G E P DE RVA DETECTADOS NAS AMOSTRAS DE FEZES COLETADAS NA CIDADE DE CURITIBA-PR DURANTE OS ANOS DE 2001 A 2008

FONTE: O autor (2011)

NOTA: PNT\*: Amostras não tipadas.

Foram genotipadas 50 (50/72 – 69,4%) amostras para as combinações G e P (Tabela 4). Não foram encontradas infecções mistas e de um modo geral observou-se uma cocirculação de distintos genótipos nos anos estudados, além disso, nota-se uma alternância entre os genótipos a cada 1 a 2 anos (Figura 13).

TABELA 4 - RESULTADO DA ANÁLISE DOS GENÓTIPOS PARA A PROTEÍNA VP7 (TIPO G) E VP4 (TIPO P) NAS AMOSTRAS DE FEZES PARA RVA NO PERÍODO DE 2001 A 2008 NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO HC-UFPR

	G1 P[8]	G2 P[4]	G4 [8]	G9 [8]	TOTAL %
2001	8 (72,7)	0	3 (27,3)	0	11 (22,0)
2002	0	0	20 (80,0)	5 (20,0)	25 (50,0)
2003	6 (100,0)	0	0	0	6 (12,0)
2004	0	0	0	1 (100,0)	1 (2,0)
2005	0	0	0	2 (100,0)	2 (4,0)
2006	0	3 (100,0)	0	0	3 (6,0)
2008	0	2 (100,0)	0	0	2 (4,0)
	14 (28,0)	5 (10,0)	23 (46,0)	8 (16,0)	50 (69,4)

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Os dados estão mostrados como número (percentagem), salvo nos casos indicados.

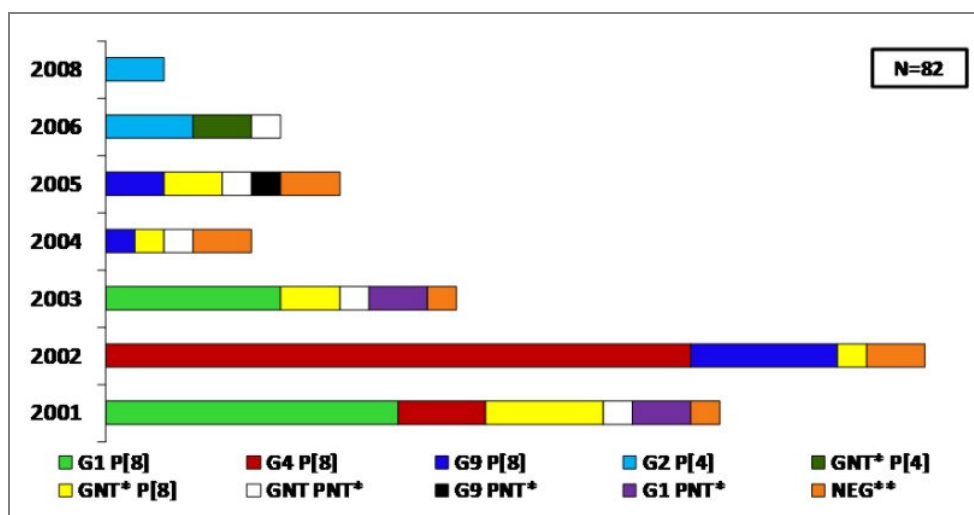


FIGURA 13 - RESULTADO DA DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DAS AMOSTRAS DE FEZES ANALISADAS POR *nested* RT-PCR *multiplex* DURANTE OS ANOS DE 2001 A 2008 NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UFPR, NA CIDADE DE CURITIBA - PARANÁ

FONTE: O autor (2011)

NOTA: \*NT: Amostras não tipadas; \*\* NEG: Amostras negativas.

### 4.3 DADOS DEMOGRÁFICOS

Em relação aos dados demográficos, a pesquisa foi realizada em 69 (69/80 - 86,2%) pacientes infectados pelo RVA. Três (3/80 - 3,8%) pacientes foram atendidos apenas no ambulatório e não apresentaram informações completas e oito (8/80 - 10%) apresentaram resultados negativos para RVA. A mediana de idade destes pacientes foi de nove meses e o intervalo interquartil (IIQ) 25 - 75 foram de seis a 16,5 meses. A distribuição dos dados por faixa etária está representado na figura 14.

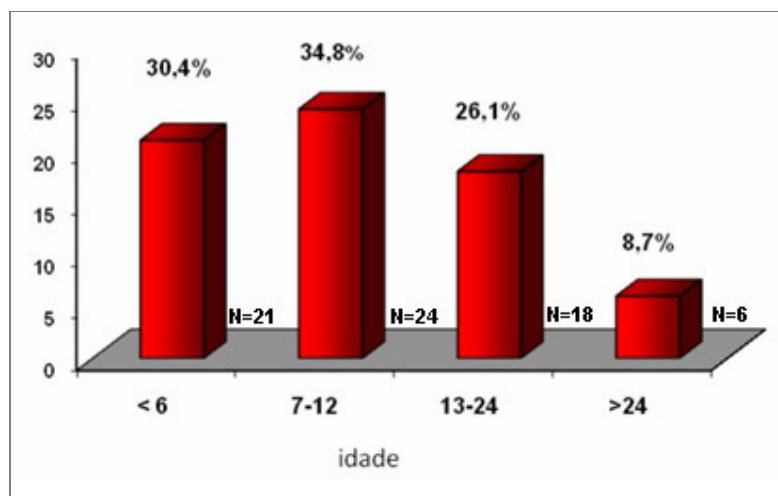


FIGURA 14 - FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES HOSPITALIZADOS E AMBULATORIAIS ATENDIDOS NO HC-UFPR NA CIDADE DE CURITIBA-PR DURANTE OS ANOS DE 2001 A 2008

FONTE: O autor (2011)

A maioria dos casos de gastroenterite aguda causada pelo RVA ocorreu em pacientes menores de 12 meses de idade (45/69 – 65,2%). Esta distribuição pode ser observada em todos os anos estudados, exceto para os anos 2006 e 2008 (Figura 15).

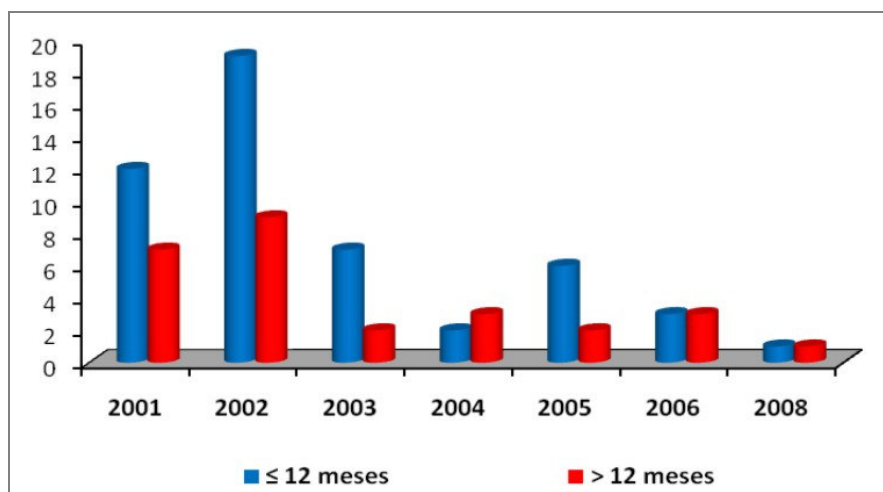


FIGURA 15 - PREVALÊNCIA DA GASTROENTERITE AGUDA CAUSADA PELOS RVA POR FAIXA ETÁRIA DURANTE OS ANOS DE 2001 A 2008  
 FONTE: O autor (2011)

Foram analisados quanto ao sexo 1.016 (1016/1140 - 89,1%) pacientes, destes, 516 (516/1016 - 50,8%) com resultados negativos e 96 (96/1016 - 9,4%) positivos para RVA pertenciam ao sexo masculino, trezentos e treze (353/1016 - 34,7%) com resultados negativos e 51 (51/1016 - 5,1%) positivos pertenciam ao sexo feminino. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,51$ ) (Figura 16).

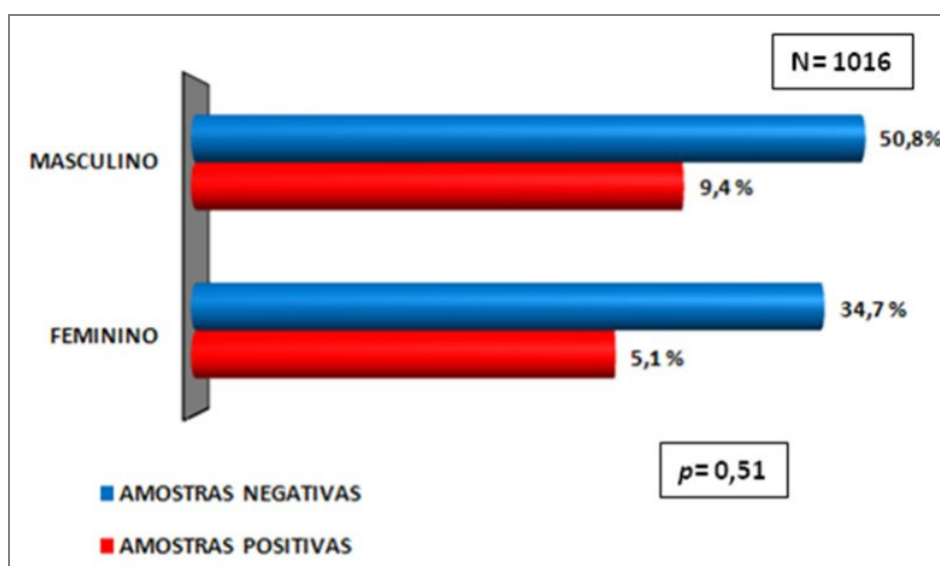


FIGURA 16 - SEXO DOS PACIENTES ATENDIDOS COM GASTROENTERITE NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UFPR NA CIDADE DE CURITIBA-PR DURANTE OS ANOS DE 2001 A 2008  
 FONTE: O autor (2011)

#### 4.4 SAZONALIDADE DAS INFECÇÕES POR RVA

A Figura 17 mostra a distribuição dos RVA nos oito anos do estudo e a sua relação com a temperatura média mensal ( $^{\circ}\text{C}$ ) e pluviosidade média mensal (cm). Os RVA foram detectados em amostras coletadas entre os meses de abril a setembro em 2001, 2002 e 2005, quando a temperatura média foi de  $15,6^{\circ}\text{C}$  e o índice de chuvas foi de 4,0cm. Em 2003 e em 2008, os RVA foram detectados durante o ano todo, sendo que a média das temperaturas desses dois anos foi de  $17,7^{\circ}\text{C}$  e o índice de chuvas foi de 3,2cm. Em 2004, foram detectados nos meses de janeiro e fevereiro e de maio a julho, quando a média de temperatura foi de  $20^{\circ}\text{C}$  e  $13,8^{\circ}\text{C}$  e o índice de chuvas foi de 3,4cm e 3,3cm, respectivamente. Em 2006, os RVA foram detectados nos meses de janeiro a julho, quando a média de temperatura foi de  $18,3^{\circ}\text{C}$  e o índice de chuvas foi de 2,3cm. Em 2007 não foi armazenada nenhuma amostra para análise neste trabalho.

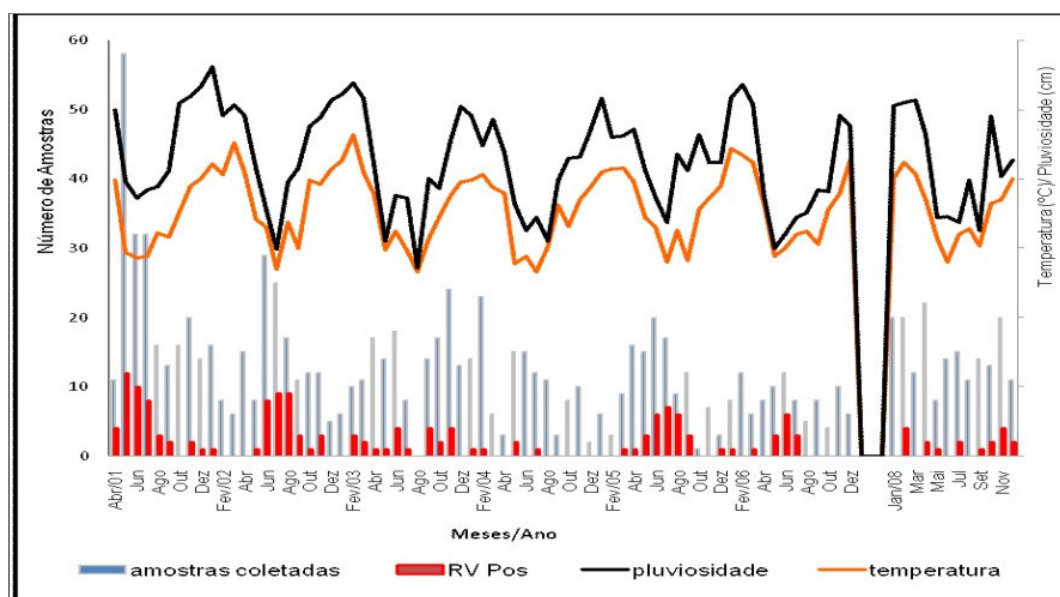


FIGURA 17 - SAZONALIDADE DOS RVA ENTRE OS ANOS DE 2001 A 2008 NA CIDADE DE CURITIBA-PR  
 FONTE: O autor (2011)



#### 4.5 LOCAL DE INTERNAMENTO

Ao se comparar o local de internamento entre o grupo de crianças com idade igual ou inferior a 12 meses e maior de 12 meses de idade, observa-se que há uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com maior frequência de pacientes com idade inferior a 12 meses na UTI ( $p=0,008$ ). Os outros locais de internamento estão representados na tabela 5.

TABELA 5 - LOCAL DE INTERNAMENTO DOS PACIENTES ATENDIDOS COM GASTROENTERITE AGUDA POR RVA NA CIDADE DE CURITIBA ENTRE OS ANOS DE 2001 A 2008

	≤12 meses % n=45	>12 meses % n=24	TOTAL n=72	<i>p</i>
Unidade de Terapia Intensiva	12 (26,7)	0	12 (16,7)	0,008
Infectopediatria	26 (57,8)	14 (58,3)	40 (55,6)	
Emergência/Ped	04 (8,9)	01 (4,2)	05 (6,9)	
TCTH/Internado <sup>(2)</sup>	01 (2,2)	0	01 (1,4)	
TCTH/Ambulatório <sup>(2)</sup>	0	01 (4,2)	01 (1,4)	
Ambulatório/Pediatria	02 (4,4)	08 (33,3)	<sup>(1)</sup> 13 (18,0)	

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Os dados estão mostrados como número (percentagem), salvo nos casos indicados.

(1) Três crianças sem informação da idade foram atendidas no ambulatório.

(2) Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas.

#### 4.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DADOS LABORATORIAIS DA INFECÇÃO POR RVA

A mediana de tempo de hospitalização dos pacientes infectados foi de cinco dias e o intervalo interquartil (IIQ 25 - 75) foi de três a sete dias. Foram a óbito três (3/80 - 3,7%) crianças, apenas uma como causa relacionada à gastroenterite.

Todos os dados laboratoriais foram analisados e separados em dois grupos de acordo com a idade, o 1.º grupo em crianças menores ou iguais a 12 meses e o 2.º grupo em maiores de doze meses. Em relação à conduta médica, além da rehidratação que foi realizada em todos os pacientes, a antibioticoterapia foi prescrita em 26 (26/36 - 72,2%) crianças do 1.º grupo e em 10 (10/36 - 27,8%) do 2.º grupo, dentre estas, trinta e duas (32/36 - 88,9%) utilizaram como antibiótico a cefalosporina de terceira geração, ceftriaxona. Comorbidades foram descritas em 25 (25/34 - 73,5%)

crianças, outros dados estão demonstrados na tabela 6.

TABELA 6 - DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES ATENDIDOS COM GASTROENTERITE AGUDA POR RVA NO HC-UFPR NA CIDADE DE CURITIBA ENTRE OS ANOS DE 2001 A 2008

	≤12 meses %	>12 meses %	TOTAL	p
Leucócitos:	13350/mm <sup>3</sup>	9650/mm <sup>3</sup>		
Mediana	8670 - 15725	7838 - 12623	55	
VIQ 25-75	(N=41) <sup>(1)</sup>	(N=14) <sup>(1)</sup>		
Parasitológico				
POS	0	1 (2,8)		
NEG	24 (66,7)	11 (30,5)	36	0,33
Pesquisa de leucócitos				
POS	3 (8,8)	1 (2,9)		
NEG	19 (55,9)	11 (32,4)	34	1,00
Presença sangue nas fezes				
POS	3 (8,8)	2 (5,9)		
NEG	22 (64,7)	7 (20,6)	34	0,59
Coprocultura				
POS	0	0		
NEG	19	6	25	
N.º de Evacuações Diárias				
≤ 5 vezes	16 (66,7)	8 (33,3)	24	
> 5 vezes	23 (76,7)	07 (23,3)	30	0,54
COMORBIDADES				
NÃO	21 (30,9)	13 (19,1)	34 (50)	
SIM	25 (36,8)	09 (13,2)	34 (50)	0,43
HIV <sup>(2)</sup>	03 (8,8)	0		
LLA <sup>(2)</sup> /LMA <sup>(2)</sup>	0	02 (5,9)		
TQB/BQL <sup>(2)</sup>	03 (8,8)	0		
BPN <sup>(2)</sup>	02 (5,9)	0		
M.BACT. <sup>(2)</sup>	02 (5,9)	02 (5,9)		
Convulsão	02 (5,9)	01 (2,9)		
Outras	13 (38,2)	04 (11,8)		

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Os dados estão mostrados como número (percentagem), salvo nos casos indicados.

(1) N = número total de amostras.

(2) Siglas: TQB= Traqueobronquite/ BQL= Bronquiolite/ BPN=Broncopneumonia/LLA= Leucemia Linfocitária Aguda/LMA = Leucemia Mielóide Aguda/M.BACT.= Meningite Bacteriana/ HIV= Portador do vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

A hipernatremia foi observada em 27 (27/55 - 49,1%) crianças. Também foram pesquisadas outras manifestações clínicas nos prontuários dos pacientes pediátricos relacionadas à infecção pelo RVA como a febre, que ocorreu em 39 (39/62 - 62,9%) crianças, os vômitos, que ocorreram em 54 (54/61 - 88,5%), e a anorexia, que foi menos frequente, encontrada somente em oito (8/58 - 13,8%).

## 4.7 GENÓTIPOS E GRAVIDADE

Quanto à avaliação da gravidade da desidratação, foi utilizado o relato dos dados clínicos anotados nos prontuários pelo médico no momento de internação de 69 (69/72-95,8%) crianças. Elas foram divididas também nos dois grupos de acordo com a idade: 1.º grupo em menores ou igual a 12 meses e 2.º grupo, maiores ou igual a 12 meses. Para o 1.º grupo, foram considerados como desidratação leve, valores de depleção de até 5% do percentil estimado de perda de peso; de 6% a 10%, como desidratação moderada e acima de 10%, desidratação grave. Para o 2.º grupo, foram considerados como desidratação leve valores de até 3% de depleção, de 4% a 6% como moderada e acima de 7%, desidratação grave (Tabela 7).

TABELA 7 - AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DA DESIDRATAÇÃO PELA INFECÇÃO POR RVA EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS DOS PACIENTES INTERNADOS E AMBULATORIAIS NA CIDADE DE CURITIBA ENTRE OS ANOS DE 2001 A 2008

DESIDRATAÇÃO	≤ 12 meses		>12 meses		TOTAL	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Leve	10	22,2	02	8,3	12	16,7
Moderada	01	2,2	01	4,2	02	2,8
Grave	25	55,6	07	29,2	32	44,5
Sem desidratação	05	11,1	08	33,3	13	18
Não Informado	04	8,9	06	25,0	<sup>(1)</sup> 13	18
	<b>45</b>	<b>65,2</b>	<b>24</b>	<b>34,8</b>	<b>72</b>	

FONTE: O autor (2011)

Nota: N= número total de amostras analisadas.

(1) Três crianças sem informação da idade.

Um total de 46 (46/59 - 78%) crianças apresentavam desidratação, trinta e seis (36/46-78,3%) pertenciam a faixa dos menores ou igual a 12 meses de idade e 10 (10/24 - 21,7%) eram maiores de 12 meses. Comparando os dois grupos com relação a presença ou não de desidratação, observa-se diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos ( $p=0,01$ ) (Figura 18).

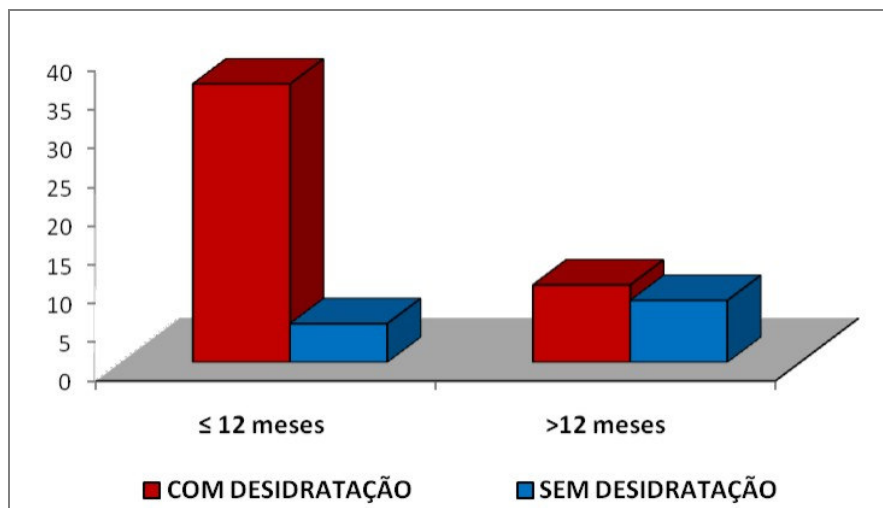


FIGURA 18 - FREQUÊNCIA DA DESIDRATAÇÃO POR RVA NOS DOIS GRUPOS ETÁRIOS ≤12 MESES E >12 MESES

FONTE: O autor (2011)

NOTA:  $p=0,01$ .

Realizou-se também a distribuição dos genótipos entre os dois grupos, considerando as combinações G e P tipados, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados ( $p=0,93$ ) (Figura 19).

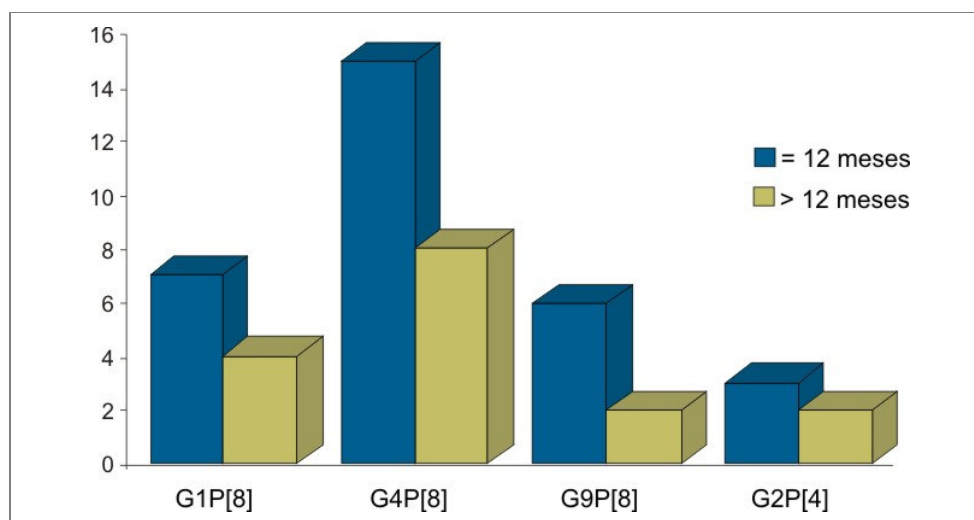


FIGURA 19 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DE ROTAVÍRUS NOS DOIS GRUPOS ETÁRIOS ≤12 MESES E >12 MESES

FONTE: O autor (2011)

NOTA:  $p=0,93$ .

Buscando correlacionar o genótipo viral com a presença da desidratação, os dados foram distribuídos conforme demonstrado na figura 20; não houve diferença estatisticamente significativa,  $p=0,12$ .

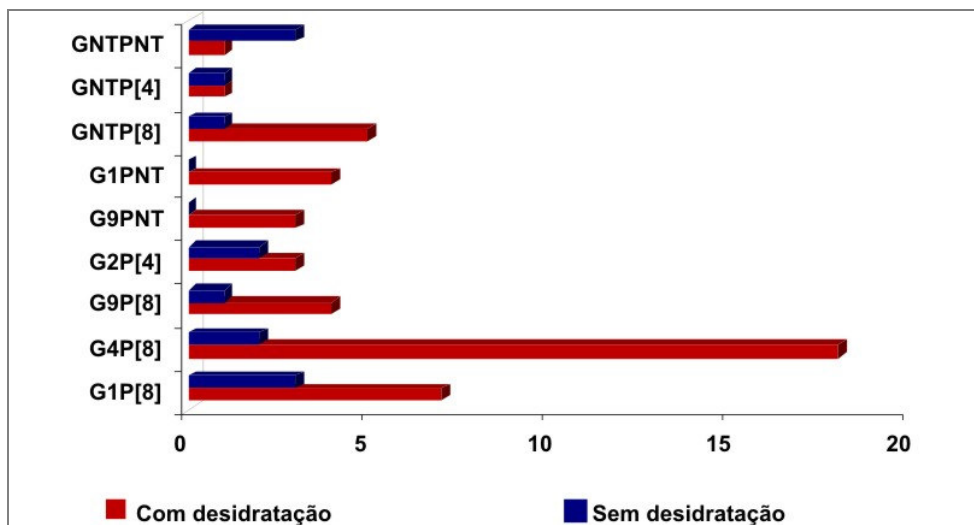


FIGURA 20 - COMPARAÇÃO ENTRE PRESENÇA DE DESIDRATAÇÃO E GENÓTIPOS DE RVA  
FONTE: O autor (2011)  
NOTA:  $p=0,12$ .

#### 4.8 PACIENTES INTERNADOS QUE APRESENTARAM INFECÇÕES NOSOCOMIAIS POR RVA

Foram consideradas como infecções nosocomiais, aquelas que ocorreram após 72 horas de admissão hospitalar. Nove (9/72-12,5%) pacientes apresentaram diarreia após esse período, a mediana de tempo de internamento foi de sete dias e o intervalo interquartil (IIQ) 25-75 de 4 a 12,5 dias. Desses pacientes, quatro (4/9 - 44,4%) estavam internados na Emergência pediátrica e cinco (5/9 - 55,6%), na Infectopediatria. Uma criança que tomou a primeira dose da vacina adquiriu infecção nosocomial pelo RVA após 63.<sup>o</sup> dia de internamento, o genótipo encontrado foi o G2P[4]. Outros dados estão descritos na figura abaixo (Quadro 3).

DATA DA COLETA	LOCAL DE INTERNAÇÃO	IDADE	GENÓTIPO	TEMPO DE INTER-NAMENTO	ANTIBIÓTICO-TERAPIA	INÍCIO DA DIARREIA	DOENÇAS DE BASE	GENÓTIPO PREVALENTE NO ANO
09/11/01	Infecto/Ped.	31 m	G1P[8]	13	Ceftriaxona	D7	M.BACT.	G1P[8]
28/05/01	Emerg. Pediátrica	2 m	G1P[8]	07	Não	D4	BQL	
09/06/02	Emerg. Pediátrica	10 m	G4P[8]	16	Ceftriaxona+cefotaxima	D6	BPN	G4P[8] e G9P[8]
25/07/02	Emerg. Pediátrica	5 m	G9P[8]	06	Ceftriaxona	D3	A.FALC.	
11/09/02	Infecto/Ped.	17 m	G4P[8]	38	Vancomicina Cefepime+ SMT/TMP	D12	LMA	
03/06/03	Emerg. Pediátrica	5 m	G1PNT	20	Ceftriaxona	D13	TQB+S.DOW	G1P[8]
21/05/04	Infecto/Ped.	7 m	GNTP[8]	18	Não	D7	HIV+CMV+IRA	GNTP[8]
07/07/04	Infecto/Ped.	17 m	GNT PNT	07	Ceftriaxona	D4	MENING.	
20/11/08 <sup>(2)</sup>	Infecto/Ped.	11 m	G2P[4]	72	Vancomicina +Meropenem	D63	TQB+BPN	G2P[4]

QUADRO 3 - DADOS DOS PACIENTES QUE APRESENTARAM INFECÇÃO NOSOCOMIAL POR RVA

FONTES: O autor (2011)

NOTA: TQB = Traqueobronquite, BPN = Broncopneumonia, BQL = Bronquiolite, LLA = Leucemia Mielóide Aguda, CMV = Citomegalovírus, IRA = Infecção Respiratória Aguda, M.Bact. = Meningite bacteriana, HIV = Portador do vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, SMT/TMP = trimetropima/sulfametoxazol, S. Down = portador da síndrome de Down, Mening. = Meningococemia, A. Fal. = Anemia Falciforme.

(1) NT: amostras não tipadas.

(2) Paciente tomou a 1.<sup>a</sup> dose da vacina contra RVA.

## 5 DISCUSSÃO

A doença diarreica é um problema de significativa magnitude em todas as comunidades, entretanto, é nos países em desenvolvimento que atinge sua maior importância, pois neles pode alcançar altas taxas de morbidade e mortalidade, sendo uma das cinco principais causas de morte no mundo (PARASHAR *et al.*, 2006). Dentre os patógenos envolvidos com esta doença, são citados os vírus, as bactérias e os parasitas. Os RVA constituem um dos principais agentes causadores de gastroenterites em pacientes pediátricos (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

As gastroenterites contribuem como uma das principais causas de internamento em pacientes pediátricos atendidos no Hospital de Clínicas da UFPR (HC-UFPR). A investigação da etiologia destes quadros infecciosos permitirá orientar as medidas terapêuticas para o atendimento destes indivíduos, evitando o uso inadequado de antibiótico e prevenindo a disseminação intra-hospitalar de patógenos provenientes da comunidade. Da mesma forma, o conhecimento sobre a prevalência destas infecções nestes pacientes norteará o estabelecimento de medidas preventivas governamentais, quer pela informação, quer pela disponibilização de tratamento de água e esgoto à população, quer pela imunização dos indivíduos expostos. Ao analisar a causa de todos os casos de gastroenterites internados no HC-UFPR, observa-se que o RVA é o patógeno encontrado com maior frequência. Um estudo realizado na Alemanha, de 2001 a 2008, onde encontraram taxas de incidência para RVA de 70% entre crianças hospitalizadas menores de 5 anos (KOCH; WIESE-POSSELT, 2011). Observa-se que houve uma distribuição desigual das amostras positivas nos diferentes anos, com uma progressiva diminuição do número de amostras investigadas a partir de 2004, antes da introdução da vacina. Esse declínio do número de casos positivos pode ser explicado pela melhoria das condições de saneamento básico pela população mais pobre da região, também pela implantação de políticas públicas de saúde com base na disponibilidade de atendimento primário nas unidades de saúde e pela política do HC-UFPR, hospital universitário de referência, em nível terciário, receber somente casos graves.

Após o início da imunização contra RVA, observou-se um maior impacto nessa redução de casos. Em estudo realizado na instituição para avaliar o impacto da vacinação contra o RVA, foram computados o número de consultas ambulatoriais

e o de internações por gastroenterites antes e depois da aplicação da vacina, no período de 2005 e 2007. Esse estudo mostrou uma redução de 54,2% e 39,4% de consultas médicas para as crianças com menos de 12 meses de idade e de 12 a 60 meses, respectivamente. Além disso, houve também uma redução de 43,9% e 33,3% das internações por gastroenterites em crianças com menos de 12 meses de idade e de 12 a 60 meses, respectivamente, considerando a cobertura vacinal em torno de 80% no período referido (RODRIGUES *et al.*, 2009).

No presente estudo, a pesquisa do RVA em amostras de fezes coletadas de pacientes hospitalizados como de pacientes ambulatoriais no HC-UFPR, entre os anos de 2001 a 2008, identificaram-se os RVA como agentes causadores das infecções gastrointestinais em 15,7% da população analisada. Mundialmente, os achados epidemiológicos apontam taxas que variam de 12% até 71% (DE ZOYSA; FEACHEM, 1985; MIDTHUN; KAPIKIAN, 1996; COLUCHI *et al.*, 2002; GIAQUINTO *et al.*, 2007; ANDRÉS *et al.*, 2008). No Brasil estudos encontraram taxas variadas de infecção por este patógeno, entre 10% a 42%, na incidência dos RVA como agente causador das infecções gastrointestinais em crianças abaixo dos cinco anos (LINHARES, 2000).

Quanto à sazonalidade dos RVA, alguns fatores têm sido relacionados com esta variabilidade, entre estes são citados comumente as diferenças climáticas existentes nas diversas regiões, sendo que há maior ocorrência das infecções por RVA nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste nos meses frios e secos, os quais correspondem ao período de abril a setembro; para as regiões Norte e Nordeste, a sazonalidade não é tão marcante ocorrendo durante o ano todo (CUNLIFFE *et al.*, 1998; CAMPOS *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2004a; SÁFADI *et al.*, 2010; JUSTINO *et al.*, 2011; CARVALHO-COSTA *et al.*, 2011). Além disso, deve ser ressaltada a importância das condições socioeconômicas da população, sendo uma infecção de maior prevalência entre aqueles com baixo poder aquisitivo e pouco acesso à informação. Quanto aos resultados obtidos neste estudo, em alguns anos foram observados o aumento dos casos positivos, principalmente durante os meses mais frios, concordando com outros achados (SANTOS *et al.*, 2008), porém, também foram encontrados índices variados de incidência da doença, com ocorrência durante o ano todo. Um estudo conduzido por Nunes *et al.* (2010), em Minas Gerais, no período de 2005 a 2007, apontou uma alta concentração de casos positivos de RVA nos meses quentes e chuvosos, sugerindo que outros fatores, além dos climáticos, podem influenciar na sazonalidade desse patógeno (NUNES *et al.*, 2010).



O diagnóstico da infecção por RVA é realizado pela detecção de antígenos virais por metodologias de fácil e rápida execução. Observa-se nos últimos anos um aumento na comercialização de reagentes diagnósticos para a identificação dos RVA, seja por meio de técnica de aglutinação de partículas em látex, seja por ensaio imunoenzimático. No laboratório de virologia do HC-UFPR, tais metodologias são aplicadas visando à liberação rápida desses resultados, o que permite orientar a conduta mais adequada para cada caso. Com o objetivo de definir o desempenho das metodologias que foram utilizadas no período do estudo, realizou-se uma análise das características operacionais dos testes de detecção rápida.

Foram avaliados, neste estudo, os testes tradicionais de detecção de antígenos, o EIE e AL, utilizados no diagnóstico de infecções por RVA. Nesta avaliação foi escolhida a técnica de EGPA, como teste padrão-ouro, pela sua alta sensibilidade e especificidade. Deve-se ressaltar que a EGPA é uma importante ferramenta na detecção de outros grupos de RV não-A, assim como na análise dos padrões eletroforéticos dos RVA, a qual é aplicada para a compreensão de sua epidemiologia. (IBRAHIM; SUNDERLAND; HART, 1990; GREGORI *et al.*, 2000; ALTINDIS *et al.*, 2004). No entanto, a utilização da técnica como teste de triagem não é recomendada, devido à necessidade de capacitação das pessoas envolvidas para sua implementação, além do tempo de execução ser mais longo do que o dos outros métodos (CHAKRAVARTI *et al.*, 1991).

Para esta avaliação, foram selecionadas 293 amostras que haviam sido analisadas pelas duas metodologias de detecção de antígenos, AL e EIE; posteriormente, fez-se o teste de EGPA para comparação dos resultados. Dentre os testes rápidos, o EIE demonstrou melhores resultados, com alta sensibilidade, especificidade e valores preditivos. Não houve diferença significativa entre as metodologias de EGPA e EIE. A razão de verossimilhança positiva e negativa mostrou que os resultados de EIE podem ser utilizados para confirmar o diagnóstico da infecção pelo RVA. Estes resultados indicam que o teste de EIE é tão sensível e específico como o método de EGPA, podendo ser aplicado em larga escala, na triagem de amostras suspeitas de diarreia por RVA com uma boa correlação com a doença (KASEMPIMOLPORN *et al.*, 1988; MOMENZADEH *et al.*, 2008; BRANDT *et al.*, 1987; CORNAGLIA *et al.*, 1989). Por outro lado, o grau de concordância dos testes analisados por medidas de Kappa nos resultados entre AL e EGPA mostrou uma concordância regular, demonstrando uma baixa sensibilidade para o teste de aglutinação em látex. Outros autores também

apresentaram valores de sensibilidade semelhantes (DENNEHY; GAUNTLET; TENTE, 1988; CORNAGLIA *et al.*, 1989). Quanto à especificidade de 81,9%, obtida no presente estudo, difere de alguns autores que relataram ter encontrado valores acima de 90% (THOMAS *et al.*, 1988; FERREIRA *et al.*, 2006; PIRKOOH; SHAHRABADI, 2007). Pesquisas mostram que o desempenho dos testes disponíveis comercialmente de AL é comparável favoravelmente com o isolamento viral e EIE (MAES *et al.*, 2003). Embora a técnica possa ser útil em determinadas situações, como surtos da doença ou em locais com poucos recursos para detecção de RVA, devido ao fato de ser um método rápido, prático e barato (JENSEN, 1985; RABONI *et al.*, 2002). Neste estudo, a variabilidade observada nos resultados de AL para alguns anos prejudicou fortemente a sua confiabilidade como teste de triagem, não sendo possível prever com seus resultados a ocorrência ou não da doença. Esta variabilidade de resultados tem contribuído para a não indicação desta metodologia em laboratórios de vigilância em saúde pública em alguns países, os quais têm optado pelo método de EIE (ATCHISON *et al.*, 2009).

Em quatro amostras foram encontrados resultados positivos na detecção de antígenos por EIE e em três por AL, com resultados negativos pela EGPA. Estas amostras foram consideradas como falsas positivas. No entanto, deve-se ressaltar que a EGPA foi realizada em momentos diferentes dos testes de triagem. Nesse período, as amostras estavam armazenadas à  $-70^{\circ}\text{C}$ , porém foram submetidas a ciclos de congelamento e degelo, podendo ter contribuído para estes resultados negativos.

A introdução do diagnóstico rápido para detecção de RVA em amostras clínicas de pacientes atendidos no HC-UFPR contribuiu com a vigilância epidemiológica das gastroenterites na cidade de Curitiba e região metropolitana, assim como a sua importância dentro do ambiente hospitalar. Adicionalmente, este diagnóstico possibilitou o conhecimento das faixas etárias mais acometidas pelos RVA, trazendo informações ao clínico ao definir o agente viral como responsável pelo quadro infeccioso, orientando a conduta terapêutica e possibilitando a retirada dos antimicrobianos, obtendo como consequência a diminuição dos custos e do período de internamento.

A implantação das técnicas de RT-PCR para o diagnóstico laboratorial de RVA, em amostras de fezes de pacientes atendidos no HC-UFPR por gastroenterite aguda, possibilitou a análise do perfil genotípico dos vírus que circularam na região no período de 2001 a 2008, assim como o conhecimento do comportamento desta doença, por meio da correlação dos achados laboratoriais, com aspectos demográficos e clínicos de pacientes ambulatoriais e internados infectados por este patógeno.

Do total de 179 amostras positivas para RVA detectadas no período de estudo, foram analisadas 80 (44,7%) amostras pela RT-PCR, o restante das amostras não pôde ser analisado por apresentar material insuficiente. Três amostras com resultados negativos nas duas técnicas EIE e AL, apresentaram na EGPA algumas bandas, que poderiam indicar RVA, para confirmar ou descartar positividade foi realizado a RT-PCR, demonstrando serem bandas inespecíficas. Todas as 80 amostras foram submetidas ao segundo PCR *multiplex*, mesmo aquelas em que as bandas não foram visualizadas no primeiro PCR. Uma hipótese da não visualização de bandas em algumas amostras no primeiro PCR pode ter sido o excesso de RNA no material extraído, fazendo com que ocorresse a inibição da reação. Essa hipótese foi levantada devido ao fato de algumas amostras necessitarem de diluição em grandes volumes para o segundo PCR, para a obtenção de bandas específicas. Duas amostras foram retiradas do total por pertencerem ao mesmo paciente e terem sido coletadas no mesmo período.

O capsídeo externo dos RVA é composto pelas glicoproteínas VP7 (genótipo G) e VP4 (genótipo P), as quais são capazes de elicitar independentemente a produção de anticorpos neutralizantes, levando à imunidade protetora. Até o momento existem 23 genótipos G e 31 genótipos P, dos quais 11 G e 12 P são descritos em humanos (MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008b; ALADIN *et al.*, 2010). A variação de genótipos G e P observada nos diferentes anos deste estudo são decorrentes dos mecanismos utilizados pelos RVA para escapar da pressão imunológica seletiva, a qual visa à manutenção do patógeno na natureza. Por tal motivo, observou-se a circulação de grande diversidade de genótipos nos anos estudados, assim como em um mesmo ano.

Analisando somente o genótipo tipo G, o G1 é considerado o genótipo predominante no mundo (ARISTA *et al.*, 2006). Neste estudo, o G1 predominou nos anos de 2001 e 2003. Em um estudo realizado por Soares *et al.* (2010) em Belém, entre dezembro de 1983 a outubro de 2003, encontraram uma maior frequência para o genótipo G1 no ano de 2003, similar ao nosso achado. Outro estudo realizado nos anos de 2000 a 2003, envolvendo amostras de crianças e adultos de diversas cidades do Estado do Paraná, encontrou o G1 como o genótipo mais predominante (SANTOS *et al.*, 2008). Já em outro estudo realizado em Campo Grande (MS), no período de maio de 2000 e janeiro de 2004, o G1 não foi detectado em nenhuma amostra analisada em 2001, o que difere deste estudo (ANDREASI *et al.*, 2007). Em 2002 e a partir de 2004 o G1 não foi mais identificado nas amostras analisadas,

porém, estes resultados não descartam a presença do G1 nos anos de 2004 e 2005, pois algumas amostras não puderam ser genotipadas. Estudos conduzidos por Leite *et al.* (2008), a estirpe G1 foi detectada em 43% dos casos durante o período pré-vacinal no Brasil; com a introdução da vacina contra este genótipo, esse número caiu para 3% das infecções por RVA (SOARES *et al.*, 2010). Em relação ao genótipo G4, este foi o mais frequente em 2002 e o segundo em 2001, em estudo conduzido por Coluchi *et al.*, 2002, no Paraguai, no período de janeiro de 1999 a março de 2000, o G4 foi encontrado em 34,3% das amostras analisadas; em outro estudo conduzido por Bok, Matson e Gomez, 2002, na Argentina, nos anos de outubro de 1996 e setembro de 1998, registrou-se 31,3% de frequência para G4 para o segundo ano do estudo.

Os primeiros relatos do genótipo G9 no mundo ocorreram no início de 1980, nos Estados Unidos (CLARK *et al.*, 1987), durante o período de 1986-1988 e 1992-1993, foi o genótipo predominante na Índia (DAS *et al.*, 1994; PAGE *et al.*, 2010). A partir de 1995, o G9 começou a ser detectado em várias partes do mundo mais frequentemente, como na América do Norte, América Central, China e África (LAIRD *et al.*, 2003; CUNLIFFE *et al.*, 2001; FANG *et al.*, 2002; PAGE *et al.*, 2010). Na América Latina, foi detectado desde 1997 no Brasil, em 1996 na Argentina e em 1999 no Paraguai (ARAÚJO *et al.*, 2001; BOK *et al.*, 2001; COLUCHI *et al.*, 2002). Atualmente é considerado o quinto genótipo mais frequente. Em análises da sequência do gene da VP7, foi identificada a existência de três linhagens filogenéticas diferentes para o G9, linhagem 1, cepas isoladas na década de 1980 dos EUA e Japão; linhagem 2, cepas isoladas da Índia e linhagem 3, de cepas atuais prevalentes no mundo. O G9 foi isolado também em animais como porcos e cordeiros (SANTOS; HOSHINO, 2005; KHAMRIN *et al.*, 2006; MARTINEZ-LASO *et al.*, 2009; PAGE *et al.*, 2010). Neste estudo, o genótipo G9 foi identificado em 2002, 2004 e 2006 em 19%, 33% e 16%, respectivamente, das amostras analisadas. Em um estudo realizado por Mast *et al.* (2010), em Taiwan, no período de dezembro 2004 a junho de 2006, a incidência de G9 encontrada foi de 34% nas crianças abaixo de 5 anos de idade. Outro estudo conduzido por Dey *et al.* (2009), em Bangladesh, durante o período de 2004-2005, o G9 foi detectado em 13,7% das amostras. No Brasil, um estudo realizado por Carmona *et al.* (2006) em São Paulo, no período de 1996 a 2003, encontrou o genótipo G9 somente a partir do ano de 2000, em 17,2% das amostras analisadas; outro estudo realizado por Volotão *et al.* (2006), no Rio de Janeiro, no período entre

janeiro de 2000 e julho de 2004, registrou 30,2% de incidência para o genótipo G9. Carvalho-Costa *et al.* (2006) conduziram um estudo no Rio de Janeiro, no período de fevereiro a setembro de 2004, em pacientes admitidos no hospital com gastroenterite aguda, sendo o G9 detectado em 40% das amostras analisadas.

Considerando a genotipagem P, neste estudo, nos anos de 2001 a 2005, todas as amostras genotipadas foram P[8], associadas ao G1, G4 e G9, já em 2006 e 2008 todas foram P[4] associada ao G2; esses resultados são similares ao encontrado em outros estudos no Brasil e no mundo (ARISTA *et al.*, 2005b; ARAÚJO *et al.*, 2007a; DEY *et al.*, 2009; ROUGEMONT *et al.*, 2011). Os genótipos P[8] e P[4] são responsáveis por mais de 90% de todos os casos de diarreia por RVA no mundo, com exceção da África, onde essa frequência foi de 70%, sendo o P[6] o segundo mais frequente (SANTOS; HOSHINO, 2005). Apesar de não ter sido identificado nenhum genótipo atípico neste estudo, há relatos de ocorrência da circulação em humanos de genótipos comumente encontrados em animais como o P[1], P[3], P[5], P[6], P[9], P[11], P[12] e P[14] em diversos lugares do mundo, confirmando a transmissão interespecie (SANTOS; HOSHINO, 2005). Em recente estudo realizado no Brasil, foram encontrados P[6] e P[9] em 1,1% das amostras analisadas (CARVALHO-COSTA *et al.*, 2011). A VP4 parece ser mais conservada e ter menor variabilidade genética do que a proteína VP7 que codifica o tipo G, isso explicaria a predominância do genótipo P[8] e P[4] em diversos estudos realizados no Brasil e no mundo (SANTOS; HOSHINO, 2005).

Analisando as combinações dos genótipos tipo G e P, o genótipo G1P[8] foi predominante no ano de 2001 e 2003, concordando com a maioria dos estudos realizados em diferentes locais do mundo que descrevem ser esse genótipo como o mais comumente encontrado (CARDOSO *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2004b; SANTOS; HOSHINO, 2005; CARMONA *et al.*, 2006; PIETRUCHINSKI *et al.*, 2006; GOUVEA *et al.*, 2007). Recentes dados de um estudo de RVA circulantes, apontaram o genótipo G1P[8] como o mais frequente, o que corrobora com os achados neste estudo para este período (SANTOS *et al.*, 2008). Em outro estudo conduzido por Carvalho-Costa *et al.* (2011), com amostras coletadas de 18 estados brasileiros no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2009, o genótipo G1P[8] foi identificado em 14% das amostras analisadas de 2005, 12,3% em 2006, 9,5% em 2007, 0,7% em 2008 (CARVALHO-COSTA *et al.*, 2011).

Em relação ao genótipo G4P[8], este estudo mostrou o seu aparecimento em 2001 como o segundo genótipo mais frequente e em 2002 foi o predominante; semelhantes achados foram relatados por Coluchi *et al.* (2002), no Paraguai, onde o mesmo foi encontrado nos anos de 1999 a 2000, como genótipo predominante. Já em outro estudo realizado por Costa *et al.* (2004), em Goiás, no período de julho de 2000 a outubro de 2002, a prevalência encontrada para esse genótipo foi de 5,6%, o que difere dos achados deste estudo (COSTA *et al.*, 2004b). A partir do ano de 2003, esse genótipo não foi mais identificado nas amostras analisadas.

O genótipo G9P[8] foi identificado neste estudo nos anos 2002, 2004 e 2005, segundo alguns relatos, a partir de 2004, esse genótipo passa a circular mais frequentemente (CARMONA *et al.*, 2006). O mesmo estudo realizado por Costa *et al.*, (2011), encontrou frequência do genótipo G9P[8] de 52% em 2005, 22% em 2006 e 3,2% em 2008 e 2009 (CARVALHO-COSTA *et al.*, 2011). Outro estudo detectou frequência de 28,5% deste genótipo em 2004 (MORILLO *et al.*, 2010). A partir de 2006, reemerge o genótipo G2P[4], tornando-se o predominante nas amostras analisadas neste estudo, sendo relatado também seu surgimento, neste período, em outros lugares do Brasil (LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES., 2008; CARVALHO-COSTA *et al.*, 2009) e do mundo (AMARILLA *et al.*, 2007; FERRERA; QUAN; ESPINOZA, 2007; RAHMAN *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2011). A alta incidência deste genótipo no Brasil criou expectativas de que a vacina RIX4414 introduzida recentemente no calendário brasileiro poderia ter selecionado o genótipo G2P[4], já que este não compartilha os antígenos de superfície VP4 e VP7 com a cepa da vacina. Outra possível explicação seria a flutuação normal dos genótipos cocirculantes de RVA, em que o genótipo G2P[4] parece ocorrer em ciclos de aproximadamente dez anos (LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES, 2008; MORILLO *et al.*, 2010). De acordo com esse fato, estão alguns estudos conduzidos em outros países como o de Portugal, no período de 2007, onde esse genótipo foi o mais prevalente e a população não havia sido vacinada (ANTUNES *et al.*, 2009; FERRERA; QUAN; ESPINOZA, 2007). Estes resultados demonstram a capacidade de variação genética dos RVA e alertam para a necessidade da vigilância constante dos genótipos virais circulantes para orientar e melhorar as estratégias em relação a futuras imunizações (PIETRUCHINSKI *et al.*, 2006; CARVALHO-COSTA *et al.*, 2006; SERRAVALLE *et al.*, 2007; DOMINGUES *et al.*, 2008; MARTINI *et al.*, 2008; MORILLO *et al.*, 2010; MASCARENHAS *et al.*, 2010; JUSTINO *et al.*, 2011).

Os dados obtidos neste estudo encontraram a infecção por RVA em mais de 90% das crianças na faixa etária de zero a 24 meses, semelhantes a outros estudos conduzidos aqui no Brasil, onde a infecção por RVA também foi encontrada principalmente dentro desta faixa etária (CARVALHO-COSTA *et al.*, 2006; CARMONA *et al.*, 2006; ANDREASI *et al.*, 2007; GOUVEA *et al.*, 2007; SILVA; SOUZA; MELO, 2010; JUSTINO *et al.*, 2011). É importante ressaltar que neste estudo mais de 30% das crianças com infecção por RVA pertenciam à faixa etária abaixo de seis meses de idade, esses dados foram semelhantes aos encontrados por Silva, Souza e Melo (2010), no estado de Pernambuco no período de maio/2007 a setembro/2008, Andreasi *et al.* (2007), em Campo Grande, no período de maio/2000 a janeiro/2004, e com os Nunes *et al.* (2010), em Minas Gerais, no período de 2005 a 2007, onde encontraram infecções sintomáticas nesta faixa etária, porém Gouvea *et al.* (2007) encontraram 19% e Justino *et al.* (2011) 2,6% de infecção por RVA nesta faixa de idade. Alguns autores sugerem ser a causa da proteção a provável transferência de anticorpos presentes no leite materno durante a amamentação (LINHARES *et al.*, 1989; FERNANDES *et al.*, 2000). Estes dados não puderam ser comprovados, pois essa investigação não foi realizada neste estudo.

Em relação ao sexo das crianças, observou-se uma predominância neste estudo do sexo masculino em comparação com o feminino, porém sem diferença estatisticamente significativa ( $p=0,51$ ), concordando com outros estudos realizados (FERNANDES *et al.*, 2000; SOUZA, 2001; ANDREASI *et al.*, 2007). Em outros achados, como de Cardoso *et al.* (2003) e Silva, Souza e Melo (2010), foi observada diferença estatisticamente significativa quanto ao predomínio do sexo masculino nos pacientes analisados.

As manifestações clínicas variam de intensidade de acordo com a faixa etária e a imunidade do hospedeiro. O quadro clínico clássico das infecções por RVA descrito na literatura ocorrem pelo início abrupto de vômito, febre, seguida da diarreia, induzindo a desidratação (GUSMÃO *et al.*, 1999; OLIVEIRA; LINHARES, 1999; LINHARES *et al.*, 2005). Estudos realizados demonstraram que os RVA são responsáveis pela maior gravidade da doença diarreica comparado a outros enteropatógenos (OLIVEIRA; LINHARES, 1999; LINHARES, 2000; KOUKOU *et al.*, 2011). É importante destacar que seis (50%) pacientes acometidos pela infecção por RVA, que necessitaram de internamento, foram admitidos na UTI, com quadro grave de desidratação, sem doença de base e menores de 12 meses de idade.

A ocorrência de febre entre crianças com RVA é um dos principais sintomas e ocorreram em 62,9% dos pacientes neste estudo, similares a outros estudos realizados (COSTA *et al.*, 2004a; NUNES *et al.*, 2010). Os vômitos foram detectados em 88,5% dos pacientes, semelhantes a outros estudos (GUSMÃO *et al.*, 1999; SILVA; SOUZA; MELO, 2010).

Alguns estudos utilizaram para mensurar a gravidade das diarreias o escore de Flores *et al.* (1987), que reúne diversos parâmetros clínicos como a duração e frequência da diarreia, vômitos e febre, necessidade de tratamento, desidratação, com o somatório máximo de 20 pontos (FLORES *et al.*, 1987). Este estudo utilizou parâmetros preconizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na classificação da desidratação, avaliados pelo médico no momento do internamento. Deve-se considerar que esta avaliação foi subjetiva e os casos avaliados foram realizados por pessoas diferentes. Os achados laboratoriais que refletem o grau de desidratação se caracterizam principalmente nos casos graves, resultante das perdas fecais de água e bicarbonato. A desidratação é classificada pelo valor do déficit de água, estimada pelos sinais clínicos em leve, moderada e grave e pelo valor do nível sérico de sódio em isotônica, hipotônica e hipertônica, 49% dos pacientes analisados apresentaram hipernatremia (BARBOSA; SZTAJNBOK, 1999).

Quanto à associação da gravidade da doença com o genótipo, não foi encontrada diferença estatística nos resultados deste estudo. Em estudos realizado por Linhares *et al.* (2006), em um ensaio clínico na América Latina, no período de 2001 a 2003, foi encontrada doença mais severa associado ao G9 (LINHARES *et al.*, 2006). Outros estudos também relataram severidade maior a esse genótipo (ITURRIZA-GÓMARA *et al.*, 2000; CUBIT; STEELE; ITURRIZA, 2000; KANG, 2006). Porém, outros autores relatam não terem encontrado diferença entre severidade da doença com paciente com infecção por G9 com infecção por outros genótipos (ARISTA *et al.*, 1997; CLARK *et al.*, 2004; AUIPAIS *et al.*, 2009). Segundo Kang (2006), a gravidade das infecções pode estar relacionada à virulência da cepa, a introdução de uma nova cepa na população e aos fatores de risco, como a desnutrição e outras comorbidades (KANG, 2006). Outros autores também sugerem que a intensidade e a gravidade da doença podem estar relacionadas a fatores virais como a NSP4 enterotoxina, NSP1 polimerase ou as proteínas da VP4 (tipo P) (MOTA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2003; AUIPAIS *et al.*, 2009). Diante desses fatos, torna-se necessária uma



vigilância constante nas infecções causadas pelos RVA, tanto na base hospitalar quanto na comunidade, para verificar a eficácia das vacinas atualmente disponíveis.

Os RVA são considerados importantes agentes etiológicos de infecções nosocomiais entre crianças; os fatores que influenciam a aquisição destas infecções podem estar relacionados com a idade, o estado imunológico, a doença de base, as intervenções diagnósticas e terapêuticas, as estações do ano e a duração do tempo de internamento (GUSMÃO *et al.*, 1995; DUCEL; FABRY; NICOLLE, 2002; GIANINO *et al.*, 2002). Os RVA também estão envolvidos nas diarreias em crianças admitidas principalmente com infecções do trato respiratório, como as bronquiolites, nas quais o pico de ocorrência do vírus sincicial respiratório coincide com os dos RVA (THURET *et al.*, 2004; CARVALHO-COSTA *et al.*, 2006). Estas infecções causam, além da morbidade, um grande impacto econômico em países desenvolvidos e em desenvolvimento (GUSMÃO *et al.*, 1999; HARRINGTON; BUTLER; CAFFERKEY, 2003). Neste estudo foram considerados como portadores de infecção nosocomial pacientes que apresentaram diarreia após 72 horas de admissão hospitalar, levando-se em conta o período inicial de incubação do RVA de 24 a 72 horas, como está descrito na literatura (LINHARES *et al.*, 2005). A prevalência encontrada foi de 12,5%; em outros estudos essa prevalência variou entre 8 e 33% (GAGGERO *et al.*, 1992; GIANINO *et al.*, 2002; KOCH; WIESE-POSSELT, 2011). Nove pacientes adquiriram infecções nosocomiais, todos possuíam doenças de base consideradas graves e que juntamente com a infecção pelo RVA pode ter contribuído para o aumento da gravidade. O tempo de hospitalização desses pacientes teve uma mediana de sete dias, similar ao encontrado por Gianino *et al.* (2002), em Turin, onde a média encontrada foi de 6,4 dias (GIANINO *et al.*, 2002). Os genótipos encontrados neste estudo que circularam nos pacientes que adquiriram infecções nosocomiais, refletiram o mesmo genótipo circulante no ano na comunidade, similar a outros achados (GUSMÃO *et al.*, 1999; CHANDRAN *et al.*, 2006). É importante salientar que a avaliação das causas das infecções nosocomiais são importantes, para que se definam estratégias eficazes para a diminuição dos custos que tais infecções acarretam nos sistemas de saúde, como, por exemplo, no tratamento, com o consumo de mais medicamentos e com o aumento no tempo de internamento, possibilitando um risco maior de exposição do paciente a outros patógenos. Em alguns estudos realizados, os autores sugerem que pequenas medidas de higiene, como lavagem das mãos antes e após o manuseio do paciente, limpeza de instrumentos após a realização de exames

entre um paciente e outro e o isolamento de pacientes infectados, poderiam ser eficazes para a diminuição dos casos de infecções nosocomiais (GLEIZES *et al.*, 2006; KORDIDARIAN; KELISHADI; ARJMANDFAR, 2007; GUTIÉRREZ-GIMENO *et al.*, 2010; BUETTCHER; HEININGER, 2010).

## 6 CONCLUSÕES

- Para o diagnóstico de RVA o teste de EIE apresentou os melhores resultados para a sensibilidade, especificidade e valores preditivos do que o teste de AL.
- A metodologia de EGPA, e *nested* RT-PCR *multiplex* para detectar os RVA, permitiu a análise retrospectiva e consequente caracterização genética de amostras de fezes coletadas entre os anos de 2001 a 2008.
- Os genótipos identificados no período do estudo foram G1 P[8], G4 P[8], G9 P[8], G2 P[4], com alternância de prevalência nos anos estudados entre esses genótipos.
- Com relação ao local de internamento foi observada diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos, com maior frequência de internamento na UTI para menores ou igual a 12 meses de idade.
- Foi observada uma diferença estatisticamente significativa com maior frequência para a presença da desidratação para o grupo menor ou igual a 12 meses de idade.
- Não se observou correlação entre o genótipo e a gravidade da infecção nos pacientes analisados.

## 7 PERSPECTIVAS

- Sequenciar as amostras que não puderam ser genotipadas para as proteínas VP4 e VP7.
- Introduzir a metodologia de biologia molecular no HC-UFPR como técnica de rotina para a pesquisa dos RVA e seus genótipos permitindo uma melhor compreensão da alternância entre estes ao longo dos anos, bem como conhecer a dinâmica desta infecção viral em nossa comunidade.
- Investigar outros vírus entéricos, tais como: astrovírus, adenovírus e norovírus, por meio da metodologia molecular (RT-PCR e PCR), e identificar casos de coinfeção.

## REFERÊNCIAS

- ABE, M.; ITO, N.; MORIKAWA, S.; TAKASU, M.; MURASE, T.; KAWASHIMA, T.; KAWAI, Y.; KOHARA, J.; SUGIYAMA, M. Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. **Virus Res**, v.144, n.1-2, p.250-7, 2009.
- AHMED, K.; ANH, D. D.; NAKAGOMI, O. Rotavirus G5P[6] in child with diarrhea, Vietnam. **Emerg Infect Dis**, v.13, n.8, p.1232-5, 2007.
- ALADIN, F.; NAWAZ, S.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; GRAY, J. Identification of G8 rotavirus strains determined as G12 by rotavirus genotyping PCR: Updating the current genotyping methods. **J Clin Virol**, v.47, n.4, p.340-4, 2010.
- ALFIERI, A. A.; LEITE, J. P. G.; ALFIERI, A. F.; JIANG, B.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R. Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. **J Virol Methods**, v.83, n.1-2, p.35-43, 1999.
- ALMEIDA, J. D.; HALL, T. The Effect of Trypsin on the Growth of Rotavirus. **J Gen Virol**, v.4, p.213-218, 1978.
- ALTENBURG, B. C.; GRAHAM, D. Y.; ESTES, M. Ultrastructural Study of Rotavirus Replication in Culture Cells. **J Gen Virol**, v.46, n.1, p.75-85, 1980.
- ALTINDIS, M.; YAVRU, S.; SIMSEK, A.; OZKUL, A.; CERI, A.; KOC, H. Rotavirus infection in children with acute diarrhea as detected by latex agglutination, ELISA and polyacrylamide gel electrophoresis. **Indian Pediatr**, v.41, p.590-4, 2004.
- AMARILLA, A.; ESPÍNOLA, E. E.; GALEANO, M. E.; FARIÑA, N.; RUSSOMANDO, G.; PARRA, G. I. Rotavirus infection in the Paraguayan population from 2004 to 2005: high incidence of rotavirus strains with short electropherotype in children and adults. **Med Sci Monit**, v.13, n.7, p.CR333-7, 2007.
- ANDREASI, M. S.; BATISTA, S. M.; TOZETTI, I. A.; OZAKI, C. O.; NOGUEIRA, M. M.; FIACCADORI, F. S.; BORGES, A. M.; SANTOS, R. A.; CARDOSO, D. D. Rotavirus A among hospitalized infants, up to three years of age, with acute gastroenteritis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.40, p.411-414, 2007.

ANDRÉS, A. L.; JIMÉNEZ-GARCÍA, R.; CARRASCO-GARRIDO, P.; ALVARO-MECA, A.; GALARZA, P. G.; DE MIGUEL, Á. G. Hospitalizations associated with rotavirus gastroenteritis in Spain, 2001-2005. **BMC Public Health**, v.8, p.109, 2008.

ANTUNES, H.; AFONSO, A.; ITURRIZA-GOMARA, M.; MARTINHO, I.; RIBEIRO, C.; ROCHA, S.; MAGALHÃES, C.; BRANCA, F.; GRAY, J. G2P[4] the most prevalent rotavirus genotype in 2007 winter season in an European non-vaccinated population. **J Clin Virol**, v.45, p.76-8, 2009.

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

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

ARIAS, C. F.; DECTOR, M. A.; SEGOVIA, L.; LÓPEZ, T.; CAMACHO, M.; ISA, P.; ESPINOSA, R.; LÓPEZ, S. RNA silencing of rotavirus gene expression. **Virus Res**, v.102, n.1, p.43-51, 2004.

ARISTA, S.; GIAMMANCO, G. M.; DE GRAZIA, S.; COLOMBA, C.; MARTELLA, V.; CASCIO, A.; ITURRIZA-GÓMARA, M. G2 rotavirus infections in a infantile population of the South of Italy: variability of viral strains over time. **J Med Virol**, v.77, n.4, p.587-94, 2005b.

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

ARISTA, S.; VIZZI, E.; FERRARO, D.; CASCIO, A.; DI STEFANO, R. Distribution of VP7 serotypes and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from Italian children with diarrhea. **Arch Virol**, v.142, p.2065-2071, 1997.

ATCHISON, C. J.; LOPMAN, B. A.; HARRIS, C. J.; TAM, C. C.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; GRAY, J. J. Clinical laboratory practices for the detection of rotavirus in England and Wales: can surveillance based on routine laboratory testing data be used to evaluate the impact of vaccination? **Euro Surveill**, v.14, n.20, pii-19217, 2009.

AUPIAIS, C.; ROUGEMONT, A.; MENAGER, C.; VALLET, C.; BRASME, J. F.; KAPLON, J.; POTHIER, P.; GENDREL, D. Severity of acute gastroenteritis in infants infected by G1 or G9 rotaviruses. **J Clin Virol**, v.46, p.282-285, 2009.

BALL, J. M.; TIAN, P.; ZENG, CQ-Y.; MORRIS, A. P.; ESTES, M. K. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. **Science**, v.272, n.5258, p.101-104, 1996.

BARBOSA, A. P.; SZTAJNBOK, J. Distúrbios hidroeletrólíticos. **J Pediatr**, v.75, s.2, p.223-33, 1999.

BARNES, G. L.; LUND, J. S.; ADAMS, L.; MORA, A.; MITCHELL, S. V.; CAPLES, A.; BISHOP, R. F. Phase 1 trial of a candidate rotavirus vaccine (RV3) derived from a human neonate. **J Paediatr Child Health**, v.33, p.300-4, 1997.

BEARDS, G. M.; CAMPBELL, A. D.; COTTRELL, N. R.; PEIRIS, J. S.; REES, N.; SANDERS, R. C.; SHIRLEY, J. A.; WOOD, H. C.; FLEWETT, T. H. Enzyme-linked immunosorbent assays based on polyclonal and monoclonal antibodies for rotavirus detection. **J Clin Microbiol**, v.19, p.248-54, 1984.

BERNSTEIN, D. I. RIX4414 (Rotarix™): a live attenuated human rotavirus vaccine. **J Pediatr** (Rio J), v.83, n.3, p.193-5, 2007.

BERNSTEIN, D. I.; SMITH, V. E.; SANDER, D. S.; PAX, K. A.; SCHIFF, G. M.; WARD, R. L. Evaluation of WC3 rotavirus vaccine and correlates of protection in healthy infants. **J Infect Dis**, v.162, p.1055-62, 1990.

BEZERRA, J. A.; STATHOS, T. H.; DUNCAN, B.; GAINES, J. A.; UDALL, J. N. Treatment of infants with acute diarrhea: what's recommended and what's practised. **Pediatrics**, v.90, p.1-4, 1992.

BHAN, M. K.; LEW, J. F.; SAZAWAL, S.; DAS, B. K.; GENTSCH, J. R.; GLASS, R. I. Protection conferred by neonatal rotavirus infection against subsequent rotavirus diarrhoea. **J Infect Dis**, v.168, n.2, p.282-7, 1993.

BHANDARI, N.; SHARMA, P.; GLASS, R. I.; RAY, P.; GREENBERG, H.; TANEJA, S.; SAKSENA, M.; RAO, C. D.; GENTSCH, J. R.; PARASHAR, U.; MALDONADO, Y.; WARD, R. L.; BHAN, M. K. Safety and immunogenicity of two live attenuated human rotavirus vaccine candidates, 116E and I321, in infants: results of a randomised controlled trial. **Vaccine**, v.24, n.31-32, p.5817-23, 2006.

BHANDARI, N.; SHARMA, P.; TANEJA, S.; KUMAR, T.; RONGSEN-CHANDOLA, T.; APPAIAHGARI, M. B.; MISHRA, A.; SINGH, S.; VRATI, S. A dose-escalation safety and immunogenicity study of live attenuated oral rotavirus vaccine 116E in infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **J Infect Dis**, v.200, n.3, p.421-29, 2009.

BISHOP, R. F.; BARNES, G. L.; CIPRIANI, E.; LUND, J. S. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection: a prospective, longitudinal study in young children. **N Engl J Med**, v.309, n.2, p.72-6, 1983.

BISHOP, R. F.; BUGG, H. C.; MASENDYGCZ, P. J.; LUND, J. S.; GORRELL, R. J.; BARNES, G. L. Serum, fecal, and breast milk rotavirus antibodies as indices of infection in mother-infant pairs. **J Infect Dis**, v.174, Suppl 1:S22-9, 1996.

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

BOK, K.; CASTAGNARO, N.; BORSA, A.; NATES, S.; ESPUL, C.; FAY, O.; FABRI, A.; GRINSTEIN, S.; MICELI, I.; MATSON, D. O.; GÓMEZ, J. A. Surveillance for rotavirus in Argentina. **J Med Virol**, v.65, p.190-8, 2001.

BOK, K.; MATSON, D. O.; GOMEZ, J. A. Genetic variation of capsid protein VP7 in genotype G4 human rotavirus strains: simultaneous emergence and spread of different lineages in Argentina. **J Clin Microbiol**, v.40, n.6, p.201622, 2002.

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, v.28, n.3, p.495-503, 1990.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Informe técnico. **Doença diarréica por rotavírus: vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano - VORH**. Brasília, mar. 2006.

BUETTCHER, M.; HEININGER, U. Prospective surveillance of nosocomial viral infections during an after hospitalization at a University Children's Hospital. **Pediatr Infec Dis J**, v.29, n.10, 2010.



CAMPOS, C. O.; ALBUQUERQUE, M. C. M.; SOARES, C. C.; VOLOTÃO, E. M. SANTOS, N. Epidemiologia das gastroenterites associadas aos rotavírus e adenovírus em humanos na cidade do Rio de Janeiro no período de 1998 a 2002. **R Ci Méd Biol**, v.2, n.1, p.21-29, jan./jun. 2003.

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

CARDOSO, D. D.; MARTINS, R. M.; KITAJIMA, E.W.; BARBOSA, A. J.; CAMAROTA, S. C.; AZEVEDO, M. S. Rotavírus e adenovírus em crianças de 0-5 anos hospitalizadas com ou sem gastroenterite em Goiânia-GO, Brasil. **Rev Inst de Med Trop São Paulo**, v.34, n.5, p.433-9, 1992.

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

CARMONA, R. C.; TIMENETSKY, M. C. S. T.; DA SILVA, F. F.; GRANATO, C. F. Characterization of rotavirus strains from hospitalized and outpatient children with acute diarrhoea in Sao Paulo, Brazil. **J Med Virol**, v.74, n.1, p.166-72, 2004.

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

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

CARVALHO-COSTA, F. A.; ASSIS, R. M.; FIALHO, A. M.; BÓIA, M. N.; ALVES, D. P. D.; MARTINS, C. M. M. A.; LEITE, J. P. G. Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.101, p.291-4, 2006.

CARVALHO-COSTA, F. A.; VOLOTÃO, E. M.; ASSIS, R. M. S.; FIALHO, A. M.; ANDRADE, J. S. R.; ROCHA, L. N.; TORT, L. F. L.; SILVA, M. F. M.; GÓMEZ, M. M.; SOUZA, P. M.; LEITE, J. P. G. Laboratory-based Rotavirus Surveillance During the Introduction of a Vaccination Program, Brazil, 2005-2009. **Pediatr Infect Dis J**, v.30, n.1, 2011.

CASTELLO, A. A.; ARVAY, M. L.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years. **Pediatr Infect Dis J**, v.23, 10 Suppl, p.S168-72, 2004.

CAUÁS, R.; FALBO, A.; CORREIA, J.; OLIVEIRA, K.; MONTENEGRO, F. Diarréia por rotavírus em crianças desnutridas hospitalizadas no Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, IMIP. **Rev Bras Saude Mater Infant**, v.6, p.s77-s83, 2006.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine - United States, 1998-1999. **MMWR**, v.48, n.27, p.577-81, 1999a.

CHAKRAVARTI, A.; KUMAR, S.; MITTAL, S. K.; BROOR, S. Comparison of latex agglutination and polyacrylamide gel electrophoresis with enzyme linked immunosorbent assay for detecting human rotavirus in stool specimens. **Indian Pediatr**, v.28, p.507-10, 1991.

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

CIARLET, M., SCHÖDEL, F. Development of a rotavirus vaccine: clinical safety, immunogenicity, and efficacy of the pentavalent rotavirus vaccine. **RotaTeg Vaccine**, v.27, Suppl. 6, p.G72-G81, 2009.

CIARLET, M.; ESTES, M. Rotaviruses: basic biology, epidemiology and methodologies. In: BRITTON, G. (Ed.). **Encyclopedia of Environmental Microbiology**. New York: John Wiley & Sons, 2002. p.2573-2773.

CIARLET, M.; LIPRANDI, F.; CONNER, M. E.; ESTES, M. K. Species specificity and interspecies relatedness of NSP4 genetic groups by comparative NSP4 analysis of animal rotaviruses. **Arch Virol**, v.145, n.2, p.371-83, 2000.

CLARK, H. F.; BORIAN, F. E.; BELL, L. M.; MODESTO, K.; GOUVEA, V.; PLOTKIN, S. A. Protective effect of WC3 vaccine against rotavirus diarrhea in infants during a predominantly serotype 1 rotavirus season. **J Infect Dis**, v.158, n.3, p.570-87, 1988.

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

CLARK, H. F.; OFFIT, P. A.; GLASS, R. I.; WARD, R. L. Rotavirus vaccines. In: PLOTKIN, S.; ORENSTEIN, W. (Ed.). **Vaccines**. 4th ed. Philadelphia, Pa: Saunders, 2004. p.1327-45.

COIRO, J. R. R.; DE ALMEIDA-NETO, A. J.; HEUSER, M. C. F.; BENDATI, M. M. A.; VASCONCELOS, V. L. Acute enteritis associated with rotavirus presence in Brazilian children: evaluations on the prevalence, therapy and age group. **J Diarrhoeal Dis Res**, v.3, p.78-83, 1985.

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

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

CORNAGLIA, E.; BARRANDEGUY, M.; FIJTMAN, N.; SCHUDEL, A. Enzymelinked immunosorbent, immunofluorescence test and electrophoretic analysis of rotaviral RNA in the diagnosis and characterization of the bovine rotavirus. **Rev Latinoam Microbiol**, v.31, p.59-62, 1989.

COSTA, P.; GRISI, S.; CARDOSO, D.; FIACCADORI, F.; SOUZA, M.; SANTOS, R. Clinical and epidemiological trends in rotavirus A infections. **Pediatrics** (São Paulo), v.26, p.151-158, 2004a.

COSTA, P.; CARDOSO, D.; GRISI, S.; SILVA, P.; FIACCADORI, F.; SOUZA, M. Rotavirus A infections and reinfections: genotyping and vaccine implications. **J Pediatric** (Rio J), v. 80, n. 2, p.119-122, 2004b.

CUBITT, W. D.; STEELE, A. D.; ITURRIZA, M. Characterisation of rotaviruses from children treated at a London hospital during 1996: emergence of strains G9P2A[6] and G3P2A[6]. **J Med Virol**, v.61, p.150-4, 2000.

CUNLIFFE, N. A.; GONDWE, J. S.; KIRKWOOD, C. D.; GRAHAM, S. M.; NHLANE, N. M.; THINDWA, B. D.; DOVE, W.; BROADHEAD, R. L.; MILYNEUX, M. E.; HART, C. A. Effect of concomitant HIV infection on presentation and outcome of rotavirus gastroenteritis in Malawian children. **Lancet**, v.358, n.9281, p.550-555, 2001.

CUNLIFFE, N.; KIRSTEN, M.; MADHI, S.; WITTE, D.; NGWIRA, B.; BOS, P.; VICTOR, J.; STEELE, K.; NEUZIL, P. V. Efficacy of human rotavirus vaccine RIX4414 in Africa during the first year of life. Abstract 449. In: **27th European Society of Paediatric Infectious Diseases (ESPID)**. Brussels, Belgium, June 9-13 2009.

CUNLIFFE, N. A.; BRESEE, J. S.; GONDWE, J.; HART, C. A. The epidemiology of diarrhoeal disease in children at Queen Elizabeth Central Hospital, Blantyre, Malawi, 1994-1997. **Mal Med J**, v.11, p.21-5, 1998.

CVE. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica. **Surtos**: casos de rotavírus por GVE 2002 a 2008. Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/rotavirus\\_dados.html](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/rotavirus_dados.html)>. Acesso em: 17 set. 2010a.

CVE. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica. **Consolidado surtos**: casos de rotavírus, Estado de São Paulo, 2002 a 2008. Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/hidri\\_estat.html](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/hidri_estat.html)>. Acesso em: 20 set. 2010b.

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

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

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.242-6, 1975.

DE OLIVEIRA, L. H.; DANOVARO-HOLLIDAY, M. C.; MATUS, C. R.; ANDRUS, J. K. Rotavirus vaccine introduction in the Americas: progress and lessons learned. **Expert Rev Vaccines**, v.7, n.3, p.345-53, 2008.

DE ZOYSA, I.; FEACHEM, R. G. Interventions for the control of diarrhea diseases among young children: rotavirus and cholera immunization. **Bull World Health Organ**, v.63, p.569-83, 1985.

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

DENNEHY, P. H.; GAUNTLET, T. D. R.; TENTE, W. E. Comparison of nine commercial immunoassays for the detection of rotavirus in fecal specimens. **J Clin Microbiol**, v.26, p.1630-4, 1988.

DESSELBERGER, U. Molecular epidemiology of rotaviruses. In: FARTHING, M. J. G. (Ed.). **Viruses and the gut**. London: Swan, 1989. p.55-69.

DEY, S. K.; HAYAKAWA, Y.; RAHMAN, M.; ISLAM, R.; MIZUGUCHI, M.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. G2 strain of rotavirus among infants and children, Bangladesh. **Emerg Infect Dis**, v.15, p.91-4, 2009.

DOMINGUES, A. L.; MORAIS, A. T.; CRUZ, R. L.; MOREIRA, L. P.; GOUVÊA, V. S. Rotavirus-associated infantile diarrhea in Uberaba, Minas Gerais, on the wake of the Brazilian vaccination program. **J Clin Virol**, v.43, n.3, p.298-301, 2008.

DONG, Y.; ZENG, C. Q. Y.; BALL, J. M.; ESTES, M. K.; MORRIS, A. P. The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.94, n.8, p.3960-5, 1997.

DUAN, Z. J.; LI, D. D.; ZHANG, Q.; LIU, N.; HUANG, C. P.; JIANG, X.; JIANG, B.; GLASS, R.; DUNCAN, S.; TANG, J. Y.; WANG, Z. S.; FANG, Z. Y. Novel Human Rotavirus of Genotype G5P[6] Identified in a Stool Specimen from a Chinese Girl with Diarrhea. **J Clin Microbiol**, v.45, n.5, p.1614-7, 2007.

DUCEL, G.; FABRY, J.; NICOLLE, L. **Prevention of hospital-acquired infections: a practical guide**. 2nd edition. Geneva: World Health Organisation, 2002.

ESONA, M. D.; GEYER, A.; BANYAI, K.; PAGE, N.; AMINU, M.; ARMAH, G. E.; HULL, J.; STEELE, A. D.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R. Novel human rotavirus genotype G5P[7] from child with diarrhea, Cameroon. **Emerg Infect Dis**, v.15, n.1, p.83-6, 2009.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 3rd ed. New York: Raven Press, 1996. p.1625-55.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.1747-85.

ESTES, M. K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiol Rev**, v.53, p.410-49, 1989.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p.1917-74.

FANG, Z.; YANG, H.; QI, J.; ZHANG, J.; SUN, L.; TANG, J.; MA, L.; DU, Z.; HE, H.; XIE, J.; LU, Y.; JI, Z.; ZHU, B.; WU, H.; LIN, S.; XIE, H.; GRIFFIN, D.; IVANOFF, B.; GLASS, R. I.; GENTCH, J. R. Diversity of rotavirus strains among children with acute diarrhea in China: 1998-2000 surveillance study. **J Clin Microbiol**, v.40, p.1875-78, 2002.

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

FERREIRA, T. L.; BECHO, M. C.; BERNARDO, A. R.; CHAVES, T. C. B.; RIBEIRO, R. S.; LIMA, J. S.; FIALHO, MADI, A.; A. M.; LEITE, J. P. G.; MAZUR, C.; MIRANDA, D. M. G. Performance of a latex agglutination test in the diagnosis of acute gastroenteritis by rotavirus. **Braz J Microbiol**, v. 37, p.587-9, 2006.

FERRERA, A.; QUAN, D.; ESPINOZA, F. Increased prevalence of genotype G2P(4) among children with rotavirus-associated gastroenteritis in Honduras. In: **17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ICC**. Munich. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell, Mar 31 - Apr 04 2007.

FLEWETT, T. H.; ARIAS, C. F.; AVENDAÑO, L. F.; GHAFLOOR, A.; MATHAN, M. M.; MENDIS, L.; MOE, K.; BISHOP, R. F. Comparative evaluation of the WHO and DAKOPATTS enzyme-linked immunoassay kits for rotavirus detection. **Bull World Health Organ**, v.67, n.4, p.369-74, 1989.

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

FLORES, J.; PÉREZ-SCHAEL, I.; GONZÁLEZ, D.; GARCIA, D.; PEREZ, M.; DAOUD, N.; CUNTO, W.; CHANOCK, R. M.; KAPIKIAN, A. Z. Protection against severe rotavirus diarrhea by rhesus rotavirus vaccine in Venezuelan infants. **Lancet**, v.1, p.882-4, 1987.

FOSTER, R. H.; WAGSTAFF, A. J. Tetravalent human-rhesus reassortant rotavirus vaccine. A review of its immunogenicity, tolerability and protective efficacy against paediatric rotavirus gastroenteritis. **Biodrugs**, v.9, p.155-78, 1998.

GABBAY, Y. B.; MASCARENHAS, J. D. P.; LINHARES, A. C.; FREITAS, R. B. Atypical rotavirus among children living in Belém, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.84, p.5-8, 1989.

GAGGERO, A.; AVENDANO, L. F.; FERNANDEZ, J.; SPENCER, E. Nosocomial Transmission of Rotavirus from Patients Admitted with Diarrhea. **J Clin Microbiol**, v.30, n.12, p.3294-7, 1992.

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. **J Clin Microbiol**, v.30, p.1365-73, 1992.

GENTSCH, J. R.; LAIRD, A. R.; BIELFELT, B.; GRIFFIN, D. D.; BANYAI, K.; RAMACHANDRAN, M.; JAIN, V.; CUNLIFFE, N. A.; NAKAGOMI, O.; KIRKWOOD, C. D.; FISCHER, T. K.; PARASHAR, U. D.; BRESEE, J. S.; JIANG, B.; GLASS, R. I. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. **J Infect Dis**, v.192, suppl 1, p.S146-S159, 2005.

GENTSCH, J. R.; WOODS, P. A.; RAMACHANDRAN, M.; DAS, B. K.; LEITE, J. P.; ALFIERI, A.; KUMAR, R.; BHAN, M. K.; GLASS, R. I. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. **J Infect Dis**, v.174, suppl. 1, p.S30-S36, 1996.

GHOSH, S.; VARGHESE, V.; SAMAJDAR, S.; SINHA, M.; NAIK, T. N.; KOBAYASHI, N. Evidence for bovine origin of VP4 and VP7 genes of human group A rotavirus G6P[14] and G10P[14] strains. **J Clin Microbiol**, v.45, n.8, p.2751-3, 2007.

GIANINO, P.; MASTRETTA, E.; LONGO, P.; LACCISAGLIA, A.; SARTORE, M.; RUSSO, R.; MAZZACCARA, A. Incidence of nosocomial rotavirus infections, symptomatic and asymptomatic, in breast-fed and non-breastfed infants. **J Hosp Infect**, v.50, p.13-7, 2002.

GIAQUINTO, C.; VAN DAMME, P.; HET, F.; GOTHEFORS, L.; VAN DER WIELEN, M. Costs of community – acquired pediatric rotavirus gastroenteritis in 7 European countries: The REVEAL Study. **J Infect Dis**, v.195, suppl 1, p.S36-S44, 2007.

GLASS, R. I.; BHAN, M. K.; RAY, P.; BAHL, R.; PARASHAR, U. D.; GREENBERG, H.; RAO, C. D.; BHANDARI, N.; MALDONADO, Y.; WARD, R. L.; BERNSTEIN, D. I.; GENTSCH, J. R. Development of candidate rotavirus vaccines derived from neonatal strains in India. **J Infect Dis**, v.192, suppl 1, p.S30-S35, 2005.

GLASS, R. I.; PARASHAR, U. D.; The promise of new rotavirus vaccines. **N Engl J Med**, v.354, p.75-7, 2006.

GLEIZES, O.; DESSELBERGER, U.; TATOCHENKO, V.; RODRIGO, C.; SALMAN, N.; MEZNER, Z.; GIAQUINTO, C.; GRIMPEL, E. Nosocomial rotavirus infection in European countries: a review of the epidemiology, severity and economic burden of hospital-acquired rotavirus disease. **Pediatr Infect Dis J**, v.25, suppl 1, p.S12-S21, 2006.

GOMES, T. A.; RASSI, V.; MacDONALD, K. L.; RAMOS, S. R. T. S.; TRABULSI, L. R.; VIEIRA, M. A.; GUTH, B. E.; CANDEIAS, J. A. N.; IVEY, C.; TOLEDO, M. R. F.; BLAKE, P. Enteropathogens associated with acute diarrheal diseases in urban infants in São Paulo, Brazil. **J Infect Dis**, v.164, n.2, p.331-337, 1991.

GONZALES-IOZA, M. R.; POLANCO-MARIN, G. G.; PUERTO-SOLIS, M. Identificação de rotavirus associado ao sorotipo G2 em Yucatan, México. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.33, n.6, p.553-7, 2000.

GOUVEA, V. S.; DOMINGUES, A. L. S.; NAVECA, F. G.; PEDRO, A. R.; BEVILACQUA, C. C. Changing epidemiology of rotavirus-related hospitalizations in Rio De Janeiro, Brazil, from 2002 to 2006. **Open J Virol**, v.1, p.47-50, 2007.

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

GOUVEA, V.; GLASS, R. I.; WOODS, P.; TANIGUICHI, K.; CLARK, H. F.; FORRESTER, B.; FANG, Z. Y. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **J Clin Microbiol**, v.28, n.2, p.276-82, 1990.

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

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M. C. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. **J Clin Microbiol**, v.32, p.1338-1340, 1994c.

GREENBERG, H. B.; CLARK, H. F.; OFFIT, P. A. Rotavirus pathology and pathophysiology. **Curr Top in Microbiol Immunol**, v.185, p.255-283, 1994.



GREGORI, F.; BRANDÃO, P. E.; ROSALES, C. A. R.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; RICHTZENHAIN, L. J.; JEREZ, J. A. Desenvolvimento de um método de ELISA para a detecção de rotavírus a partir de material fecal. **Arqs Inst Biol**, v.67, n.2, p.191-4, 2000.

GRIFFIN, D. D.; NAKAGOMI, T.; HOSHINO, Y.; NAKAGOMI, O.; KIRKWOOD, C. D.; PARASHAR, U. D.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R. The National Rotavirus Strain Surveillance System. Characterization of nontypeable rotavirus strains from the United States: identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6], G12) and rare P3[9] strains related to bovine rotaviruses. **Virology**, v.294, p.256-69, 2002.

GRIMWOOD, K.; KIRKWOOD, C. D. Human rotavirus vaccines: too early for the strain to tell. **Lancet**, v.371, p.1144-5, 2008.

GRUNOW, J. E.; DUNTON, S. F.; WANER, J. L. Human rotavirus like particles in hepatic abscess. **J Pediatr**, v.106, p.73-6, 1985.

GUNSON, R. N.; MILLER, J.; LEONARD, A.; CARMAN, W. F. Importance of PCR in the diagnosis and understanding of rotavirus illness in the community. **Commun Dis Public Health**, v.6, n.1, p.63-5, 2003.

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

GURWITH, M.; WENMAN, W.; HINDE, D.; FELTHAM, S.; GREENBERG, H. A prospective study of rotavirus infection in infants and young children. **J Infect Dis**, v.144, p.218-24, 1981.

GUSMÃO, R. H. P.; MASCARENHAS, J. D. P.; GABBAY, Y. B.; LINS-LAINSON, Z.; RAMOS, F. L. P.; MONTEIRO, T. A. F.; VALENTE, S. A.; LINHARES, A. C. Rotaviruses as a Cause of Nosocomial, Infantile Diarrhoea in Northern Brazil: Pilot Study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.90, n.6, p.743-9, 1995.

GUSMÃO, R. H.; MASCARENHAS, J. D.; GABBAY, Y. B.; LINS-LAINSON, Z.; RAMOS, F. L.; MONTEIRO, T. A.; VALENTE, S. A.; FAGUNDES-NETO, U.; LINHARES, A. C. Rotavirus subgroups, G serotypes and electrophoretotypes in cases of nosocomial infantile diarrhoea in Belém, Brazil. **J Trop Pediatr**, v.45, p.81-86, 1999.

GUTIÉRREZ-GIMENO, M. V.; MARTIN-MORENO, J. M.; DÍEZ-DOMINGO, J.; ASENSI-BOTET, F.; HERNÁNDEZ-MARCO, R.; CORRECHER-MEDINA, P.; SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Nosocomial rotavirus gastroenteritis in Spain: a multicenter prospective study. **Pediatr Infect Dis J**, v.29, n.1, p.23-7, 2010.

HARRINGTON, M.; BUTLER, K.; CAFFERKEY, M. Rotavirus infection in hospitalized children: incidence and impact on healthcare resources. **Ir J Med Sci**, v.172, p.33-6, 2003.

HEATON, P. M. Phase III development of Merck's polyvalent human-bovine reassortant rotavirus vaccine, Rotateq. In: **Program and abstracts of the 6th International Rotavirus Symposium** (Mexico City). DC: Albert B. Sabin Vaccine Institute, 2004. p.18.

HEATON, P. M.; CIARLET, M. Vaccines: the pentavalent rotavirus vaccine: discovery to licensure and beyond. **Clin Infect Dis**, v.45, n.12, p.1618-24, 2007.

HERMANN, J. E.; CHEN, S. C.; FYNAN, E. F.; SANTORO, J. C.; GREEBERGER, H. B.; ROBINSON, H. L. DNA vaccines against rotavirus infections. **Arch Virol Suppl**, v.12, p.207-15, 1996.

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

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

IBRAHIM, O. S.; SUNDERLAND, D.; HART, C. A. Comparison of four methods for detection of rotavirus in faeces. **Trop Doct**, v.20, p.30-2, 1990.

IJAZ, M. K.; NUR-E-KAMAL, M. S.; DAR, F. K.; UDUMAN, S.; REDMOND, M. J.; ATTAH-POKU, S. K.; DENT, D.; BABIUK, L. A. Inhibition of rotavirus infection in vitro and in vivo by a synthetic peptide from VP4. **Vaccine**, v.16, p.916-20, 1998.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; CUBITT, D.; STEELE, D.; GREEN, J.; BROWN, D.; KANG, G.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. Characterization of rotavirus G9 strains isolated in the UK between 1995 and 1998. **J Med Virol**, v.61, p. 510-7, 2000.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; WONG, C.; BLOME, S.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **J Virol**, v.76, p.6596-6601, 2002.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; KANG, G.; MAMMEN, A.; JANA, A.K.; ABRAHAM, M.; DESSELBERGER, U.; BROWN, D.; GRAY, J. Characterization of G10P[11] rotaviruses causing acute gastroenteritis in neonates and infants in Vellore, India. **J Clin Microbiol**, v.42, p.2541-7, 2004.

JENSEN, A. Evaluation of two commercial kits for rapid detection of human rotavirus in feces: Rotalex, a latex agglutination test and Rotavirus ELISA Kit. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B**, v.93, p.159-60, 1985.

JIANG, B.; GENTSCH, J. R.; GLASS, R. I. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. **Clin Infect Dis**, v.34, p.1351-61, 2002.

JUSTINO, M. C. A.; LINHARES, A. C.; LANZIERI, T. M.; MIRANDA, Y.; MASCARENHAS, J. D. P.; ABREU, E.; SYLVIA F. S. GUERRA, S. F. S. G.; ALESSILVA S. L. OLIVEIRA, A. S.L.; SILVA, V. B.; NERVO SANCHEZ, N.; MEYER, N.; SHAFI, F.; ORTEGA-BARRIA, E.;SORIANO- GABARRO, M.; COLINDRES, R. E. The Effectiveness of the Monovalent G1P[8] Human Rotavirus Vaccine Against Hospitalization for Severe G2P[4] Rotavirus Gastroenteritis in Belém, Brazil. **J Pediatr Infect Dis**. v.30, n.5, 2011.

KANG, G. Rotavirus genotypes and severity of diarrheal disease. **Clin Infect Dis**, v.43, p.315-6, 2006.

KANG, G.; ITURRIZA-GOMARA, M.; WHEELER, J. G.;CRYSTAL, P.; MONICA, B.; RAMANI, S.; PRIMROSE, B.; MOSES, P. D.; GALLIMORE, C. I.; ROWN, D. W.;GRAY, J. Quantitation of Group A Rotavirus by Real-Time Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction Correlation With Clinical Severity in Children in South India **J Med Virol**, v.73, p.118-22, 2004.

KAPIKIAN, A. Z. A rotavirus vaccine for prevention of severe diarrhoea of infants and young children: development, utilization and withdrawal. **Novartis Found Symp**, v.238, p.153-71, 2001. Discussion 171-9.

KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: FIELD, B. N. *et al.* (Eds.). **Virology**. 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p.1657-708.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.1787-1833.

KASEMPIMOLPORN, S.; LOUISIRIROTCHANAKUL, S.; SINARACHATANANT, P.; WASI, C. Polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining for detection of rotavirus in stools from diarrheic patients in Thailand. **J Clin Microbiol**, v.26, p.158-60, 1988.

KHAMRIN, P.; PEERAKOME, S.; WONGSAWASDI, L.; TONUSIN, S.; SORNCHAI, P.; MANEERAT, V.; KHAMWAN, C.; YAGYU, F.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H.; MANEEKARN, N. Emergence of human G9 rotavirus with an exceptionally high frequency in children admitted to hospital with diarrhea in Chiang Mai, Thailand. **J Med Virol**, v.78, p.273-80, 2006.

KIRKWOOD, C. D.; PALOMBO, E. A. Genetic characterization of the rotavirus nonstructural protein, NSP4. **Virology**, v.236, n.2, p.258-65, 1997.

KOCH, J.; WIESE-POSSELT, M. Epidemiology of Rotavirus Infections in Children < 5 Years of Age, Germany, 2001-2008. **Pediatric Infectious Dis J**, v.30, n.2, 2011.

KONNO, T.; SUZUKI, H.; KUTSUZAWA, T.; IMAI, A.; KATSUSHIMA, N.; SAKAMOTO, M.; KITAOKA, S. Human rotavirus and intussusception. **N Engl J Med**, v.297, p.945, 1977.

KORDIDARIAN, R.; KELISHADI, R.; ARJMANDFAR, Y. Nosocomial Infection due to Rotavirus in Infants in Alzahra Hospital, Isfahan, Iran. **J Health Popul Nutr**, v.25, n.2, p.231-5, 2007.

KOUKOU, D.; GRIVEA, I.; ROMA, E.; TSIONI, H.; TRIMIS, G.; GALANAKIS, E.; FARMAKI, E.; IOSIFIDIS, E.; MICHOS, A.; SIAMOPOULOU- MAVRIDOU, A.; KALMANTI, M.; PAPADOPOULOU, H.; ROILIDES, E.; THEODORIDOU, M.; SYROGUIANNOPOULOS, G. A.; SYRIOPOULOU, V. Frequency, Clinical Characteristics, and Genotype Distribution of Rotavirus Gastroenteritis in Greece (2007-2008). **J Med Virol**, v.83, p.165-9, 2011.

KRISHNAN, T.; SEN, A.; CHOUDHURY, J. S.; DAS, S.; NAIK, T. N.; BHATTACHARYA, S. K. Emergence of adult diarrhoea rotavirus in Calcutta, India. **Lancet**, v.353, p.380-381, 1999.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-5, 1990.

LAIRD, A. R.; GENTSCH, J. R.; NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O.; GLASS, R. I. Characterization of serotype G9 rotavirus strains isolated in the United States and India from 1993 to 2001. **J Clin Microbiol**, v.41, p.3100-11, 2003.

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

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

LIMBOS, M. A. P.; LIEBERMAN, J. M. Disseminated intravascular coagulation associated with rotavirus gastroenteritis: report of two cases. **Clin Infect Dis**, v.22, p. 834-6, 1996.

LIN, S. L.; TIAN, P. Detailed computational analysis of a comprehensive set of group A rotavirus NSP4 proteins. **Virus Genes**, v.26, n.3, p.271-82, 2003.

LINHARES, A. C. Acute diarrhoea associated with rotavirus among children living in Belém, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.77, n.3, p.384 -90, 1983.

LINHARES, A. C. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. **Cad Saude Publica**, v.16, p.629-46, 2000.

LINHARES, A. C. Rotavirus infection in Brazil: Epidemiology, immunity, and potential vaccination. **Braz J Infect Dis**, v.1, p.284-93, 1997.

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

LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; FREITAS, R. B. de; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; MASCARENHAS, J. D. P.; LOUREIRO, E. C. B. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. **Epidemiol Infect**, v.102, n.5, p.129-45, 1989.

LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; MASCARENHAS, J. D. P.; FREITAS, R. B.; FLEWETT, T. H.; BEARDS, G. M. Epidemiology of rotavirus subgroups and serotypes in Belém, Brazil: a three-year study. **Ann Inst Pasteur Virol**, v.139, n.1, p.89-99, 1988.

LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; MASCARENHAS, J. D. P.; OLIVEIRA, C. S.; GUSMÃO, R. H. P. Gastroenterites por rotavírus. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Orgs.). **Tratado de infectologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. v.1. p.411-23.

LINHARES, A. C.; MAGALHÃES-MOURA, J. M.; GABBAY, Y. B.; RABELO-MENDES, P. S. C.; MASCARENHAS, J. D. P.; de AZEVEDO, R. C. Rotavirus serotypes and electrophoretotypes among children attending three paediatric hospitals in Belém, Brazil. **J Trop Pediatr**, v.39, n.3, p.137-41, 1993.

LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; SCHMETZ, C.; MÜLLER, G.; PETERS, D. Duovirus (rotavirus) em Belém do Pará, Brasil (nota prévia). **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.19, p.278-79, 1977.

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

LIPSON, S. M.; LEONARDI, G. P.; SALO, R. J.; SCHUTZBANK, T. E.; KAPLAN, M. H. Occurrence of nonspecific reactions among stool specimens tested by the Abbott TestPack rotavirus enzyme immunoassay. **J Clin Microbiol**, v.28, n.6, p.1132-34, 1990.

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

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. **J Clin Microbiol**, v.41, n.11, p.5153-58, 2003.

LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Pathogenesis of Rotavirus diarrhea. **Microbes Infect**, v.3, p.1145-1156, 2001.

LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. The enteric nervous system and infectious diarrhea. In: DESSELBERGER, U.; GRAY, J. (Ed.). **Viral gastroenteritis**. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, 2003. p.51-68.

LYNCH, M.; LEE, B.; AZIMI, P.; GENTSCH, J.; GLASER, C.; GILLIAM, S.; CHANG, H. G. H.; WARD, R.; GLASS, R.I. Rotavirus and central nervous system symptoms: cause or contaminant? Case reports and review. **Clin Infect Dis**, v.33, n.7, p.932-8, 2001.

MACEDO, C. I.; CHRISTOFOLETTI, A.; MUNFORD, V.; RÁCZ, M. L. G and P rotavirus genotypes in stool samples from children in Teresina, State of Piauí. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.40, n.4, p.381-384, 2007.

MACKAY, I. M.; K. E.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Res**, v.30, p.1292-1305, 2002.

MACKOW, E. R. Group B and C rotaviruses. In: BLASER, M. J.; SMITH, P. D.; RAVDIN, J. I.; GREENBERG, H. B.; GUERRANT, R. L. (Ed.). **Infections of the Gastrointestinal Tract**. New York: Raven Press, 1995. v.3. p.983-1008.

MAES, R. K.; GROOMS, D. L.; WISE, A. G.; HAN, C.; CIESICKI, V.; HANSON, L.; VICKERS, M. L.; KANITZ, C.; HOLLAND, R. Evaluation of a human group a rotavirus assay for on-site detection of bovine rotavirus. **J Clin Microbiol**, v.41, p.290-4, 2003.

MARTINEZ-LASO, J.; ROMA, N. A.; HEAD, J.; CERVERA, I.; RODRIGUEZ, M.; RODRIGUEZ-AVIAL, I.; PICAZO, J.J. Phylogeny of G9 rotavirus genotype: a possible explanation of its origin and evolution. **J. Clin. Virol**, v.44, n.1, p.52-7, 2009.

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

MASCARENHAS, J. D.; GUSMÃO, R. H. P.; BARARDI, C. R. M.; PAIVA, F. L.; SIMÕES, C. O.; GABBAY, Y. B.; MONTEIRO, T. A. F.; LINHARES, A. C. Characterization of rotavirus P genotypes circulating among pediatric patients in northern Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.41, p.165-70, 1999.

MASCARENHAS, J. D.; LIMA, C. S.; OLIVEIRA, D. S.; GUERRA, S. F. S.; MAESTRI, R. P.; GABBAY, Y. B.; LIMA, I. C. G.; MENEZES, E. M. C.; LINHARES, A. C.; BENSABATH, G. Identification of Two Sublineages of Genotype G2 Rotavirus Among Diarrheic Children in Parauapebas, Southern Pará State, Brazil. **J Med Virol**, v.82, p.712-9, 2010.

MAST, T. C.; CHEN, P. Y.; LU, K. C.; HSU, C. M.; LIN, H. C.; LIAO, W. C.; LIN, D. P.; CHEN, H. C.; LAC, C. Epidemiology and economic burden of rotavirus gastroenteritis in hospitals and paediatric clinics in Taiwan, 2005-2006. **Vaccine**, v.28, n.17, p.3008-13, 2010.

MATSUI, S. M.; MACKOW, E. R.; MATSUNO, S.; PAUL, P. S.; GREENBERG, H. B. Sequence analysis of gene 11 equivalents from "short" and "super short" strains of rotavirus. **J Virol**, v.64, n.1, p.120-4, 1990.

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

MATTHIJNSSENS, J., RAHMAN, M., VAN RANST, M. Two out of the 11 genes of an unusual human G6P[6] rotavirus isolate are of bovine origin. **J Gen Virol**, v.89, p.2630-5, 2008a.

MATTHIJNSSENS, J., TARAPOREWALA, Z., YANG, H., RAO, S., YUAN, L., CAO, D., HOSHINO, Y.; MERTENS, P., CARNER, G., MCNEAL, M., SESTAK, K., VAN RANST, M.; PATTON, J. T. Simian rotaviruses possess divergent gene constellations originating from interspecies transmission and reassortment. **J Virol**, v.84, n.4, p.2013-26, 2009a.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; ESTES, M. K.; GENTSCH, J. R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; KIRKWOOD, C. D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.; NAKAGOMI, O.; PATTON, J. T.; RUGGERI, F.; SAIF, L. J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Arch Virol**, v.153, n.8, p.1621-9, 2008b.

MATTHIJNSSENS, J.; JOELSSON, D. B.; WARAKOMSKI, D.J.; ZHOU, T.; MATHIS, P. K.; VAN MAANEN, M. H.; RANHEIM, T. S.; CIARLET, M. Molecular and biological characterization of the 5 human-bovine rotavirus (WC3)-based reassortant strains of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeg®. **Virology**, v.403, p.111-27, 2010.

MATTHIJNSSENS, J.; POTGIETER, C.A., CIARLET, M., PARREÑO, V., MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; GARAICOECHEA, L.; PALOMBO, E. A.; NOVO, L.; ZELLER, M.; ARISTA, S.; GERNA, G.; RAHMAN, M.; VAN RANST, M. Are human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates belonging to the mammalian order of Artiodactyla? **J. Virol**, v.83, n.7, p.2917-29, 2009b.

MATTHIJNSSENS, J.; RAHMAN, M.; YANG, X.; DELBEKE, T.; ARIJS, I.; KABUE, J. P.; MUYEMBE, J.J.; VAN RANST, M. G8 rotavirus strains isolated in the Democratic Republic of Congo belong to the DS-1-like genogroup. **J Clin Microbiol**, v.44, p.1801-9.28-33, 2006.

MATTION, N. M.; COHEN, J.; ESTES, M. K. The rotavirus proteins. In: KAPIKIAN, A. Z. (Ed.). **Viral Infections of the Gastrointestinal Tract**. New York: Marcel Dekker, 1994. p.169-249.

MENEGHETTI, A. C.; BOLOGNINI, A.; LAURETTI, F.; LINHARES, R.; SANTOS, N.; NOZAWA, C. Incidence of group A rotavirus in urban and rural areas of the city of Londrina-Brazil, from 1995 to 1997. **Braz Arch Biol Technol**, v.44, n.3, p.257-261, 2001.

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



MOGILNER, B. M.; BAR-YOCHAI, A.; MISKIN, A.; SHIF, I.; ABOUDI, Y. Necrotizing enterocolitis associated with rotavirus infection. **Isr J Med Sci**, v.19, p.894-6, 1983.

MOMENZADEH, A.; MODARRES, S.; FARAJI, A.; MOTAMED, M.; SOHRABI, A.; AZARNOUSH, L.; MIRSHABI, H. Comparison of Enzyme Immunoassay, Immunochromatography, and RNA-Polyacrylamide-gel Electrophoresis for Diagnosis of Rotavirus Infection in Children with Acute gastroenteritis. **Iran J Med Sci**, v.33, p.173-6, 2008.

MORILLO, S. G.; LUCHS, A.; CILLI, A.; COSTA, F. F.; CARMONA, R. C. C.; TIMENETSKY, M. C. S. T.. Caracterização de genótipos de rotavírus em creches: era pré- e pós-vacinação contra o rotavírus. **Pediatr (Rio J.)**, v.86, n.2, 2010.

MORRIS, A. P.; SCOTT, J. K.; BALL, J. M.; ZENG, C. Q.; O'NEAL, W. K.; ESTES, M. K. NSP4 elicits age dependent diarrhea and Ca(2+)mediated I(-) influx into intestinal crypts of CF mice. **Am J Physiol**, v.277, n.2, p.431-44, 1999.

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

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

MURPHY, B. R.; MORENS, D. M.; SIMONSEN, L.; CHANOCK, R. M.; LA MONTAGNE, I. R.; KAPIKIAN, A. Z. Reappraisal of the association of intussusception with the licensed live rotavirus vaccine challenges initial conclusions. **J Infect Dis**, v.187, p.1301-08, 2003.

MURPHY, T. V.; GARGIULLO, P. M.; MASSOUDI, M. S.; NELSON, D. B.; JUMAAN, A. O.; OKORO, C. A.; ZANARDI, L. R.; SETIA, S.; FAIR, E. L.; LeBARON, C. W.; SCHWARTZ, B.; WHARTON, M.; LIVINGOOD, J. R. Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. **N Engl J Med**, v.344, n.8, p.564-572, 2001.

NGUYEN, T. V.; LOSEF, C.; JEONG, K.; KIM, Y.; CHANG, K. O.; LOUGREN-BENGTSSON, K.; MOREIRA, B.; AZEVEDO, M. S. P.; LEWIS, P.; NIELSEN, P.; YUAN, L.; SAIF, L. J. Protection and antibody responses to oral priming by attenuated human rotavirus followed by oral boosting with 2/6 rotavirus-like particles with immunostimulating complexes in gnotobiotic pigs. **Vaccine**, v.21, p.4059-70, 2003.

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

NORDGREN, J.; BUCARDO, F.; SVENSSON, L.; LINDGREN, P. E. Novel Light-Up-on-Extension Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection, Quantification, and Genogrouping of Group A Rotavirus. **J Clin Microbiol**, v.48, n.5, p.1859-1865, 2010.

NUNES, A. A.; MELLO, L. M.; PARRODE, R. N.; BITTAR, J. P. M.; DOMINGUES, A. L. D. Prevalence of Rotavirus in Acute Diarrhea and its Association with Clinical Signs and Symptoms. **J Trop Pediatr**, v.56, n.3, p.212-3, 2010.

OISHI, I.; KIMURA, T.; MURAKAMI, T.; HARUKI, K.; SETO, Y.; MINEKAWA, Y.; FUNAMOTO, H. Serial observations of chronic rotavirus infection in an immunodeficient child. **Microbiol Immunol**, v.35, p.953-61, 1991.

OLIVEIRA, C. S.; GABBAY, Y. B.; MASCARENHAS, J. D. P.; LINHARES, A. C. Infecções por rotavírus. In: FARHAT, C. K.; CARVALHO, L. H. F. R.; SUCCI, R. C. M. (Org.). **Infectologia pediátrica**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p.599-609.

OLIVEIRA, C. S.; LINHARES, A. C. Rotavírus: aspectos clínicos e prevenção. **J Pediatr**, v.75, s. 1, p.91-102, 1999.

OSHITANI, H.; KASOLO, F. C.; MPABALWANI, M.; LUO, N. P.; MATSUBAYASHI, N.; BHAT, G. H.; SUZUKI, H.; NUMAZAKI, Y.; ZUMLA, A.; DUPONT, H. Association of rotavirus and human immunodeficiency virus infection in children hospitalized with acute diarrhea, Lusaka, Zambia. **J Infect Dis**, v.169, p.897-900, 1994.

OTSU, R. A mass outbreak of gastroenteritis associated with group C rotaviral infection in schoolchildren. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v.21, p.75-80, 1998.

PAGE, N.; ESONA, M.; ARMAH, G.; NYANGAO, J.; MWENDA, J.; SEBUNYA, T.; BASU, G.; PYNDIAH, N.; POTGIETER, N.; GEYER, A.; STEELE, A. D. Emergence and characterization of Serotype G9 Rotavirus Strains from Africa. **J Infect Dis**, v.202, (S1), p.55-63, 2010.

PANG, X. L.; JOENSUU, J.; VESIKARI, T. Detection of rotavirus RNA in cerebrospinal fluid in a case of rotavirus gastroenteritis with febrile seizures. **Pediatr Infect Dis J**, v.15, p.543-4, 1996.

PARASHAR, U. D.; GIBSON, C. J.; BRESEE, J. S.; GLASS, R. I. Rotavirus and severe childhood diarrhea. **Emerg Infect Dis**, v.12, n.2, p.304-6, 2006.

PARASHAR, U. D.; HUMMELMAN, E. G.; BRESEE, J. S.; MILLER, M. A.; GLASS, R. I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerg Infect Dis**, v.9, n.5, p.565-72, 2003.

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

PATEL, M. M.; STEELE, D.; GENTSCH, J. R.; WECKER, J.; GLASS, R. I.; PARASHAR, U. D. Real-world Impact of Rotavirus Vaccination. **Pediatr Infect Dis J**, v.30, n.1, p.S1-S5, 2011.

PATTON, J. T.; CHEN, D. RNA-Binding and Capping Activities of Proteins in Rotavirus Open Cores. **J Virol**, v.73, n.2, p.1382-1391, 1999.

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

PÉREZ-SCHAEL, I.; GARCIA, D.; GONZÁLEZ, M.; GONZÁLEZ, R.; DAOUD, N.; PÉREZ, M.; CUNTO, W.; KAPIKIAN, A. Z.; FLORES, J. Prospective study of diarrheal diseases in Venezuelan children to evaluate the efficacy of rhesus rotavirus vaccine. **J Med Virol**, v.30, p.219-29, 1990.

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

PIRKOORH, A.; SHAHRABADI, M. Development of a latex agglutination method for diagnosis of rotavirus infections. **Iran J Med Sci**, v.32, p.100-4, 2007.

PURDHAM, D. R.; PURDHAM, P. A.; EVANS, N.; MCNEISH, A. S. Letter: Isolation of human rotavirus using human embryonic gut monolayers. **Lancet**, v.2, n.7942, p.977, 1975.

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. **Am J Clin Pathol**, v.117, p.392-4, 2002.

RAHMAN, M.; MATTHIJNSSENS, J.; YANG, X.; DELBEKE, T.; ARIJS, I.; TANIGUCHI, K.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; IFTEKHARUDDIN, N.; AZIM, T.; VAN RANST, M. Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. **J Virol**, v.81, n.5, p.2382-90, 2007.

RAHMAN, M.; MATTHIJNSSENS, J.; NAHAR, S.; PODDER, G.; SACK, D.A.; AZIM, T.; VAN RANST, M. 2005. Characterization of a novel P[25]G11 human Group A rotavirus. **J. Clin. Microbiol.**v. 43, p. 3208-3212, 2005.

RAMIG, R. F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **J Virol**, v.78, n.19, p.10213-20, 2004.

RIPPINGER, C. M.; PATTON, J. T.; MCDONALD, S. M. Complete genome sequence analysis of candidate human rotavirus vaccine strains RV3 and 116E. **Virology**, v.405, p.201-13, 2010.

RODRIGUES, C.; ZATTAR, J.; ROSSONI, A.; STROPARO, E.; ROQUE, D.; ROMAGNOLI, L. Impact of vaccination against rotavirus in outpatients visits and hospitalization due to gastroenteritis in a university hospital in Brazil. In: **6th Annual Meeting of the World Society for pediatric Infectious Diseases**, Buenos Aires, 2009.

RODRIGUEZ, C. A. R.; BRANDÃO, P. E.; FERREIRA, F.; GREGORI, F.; BUZINARO, M. G.; JEREZ, J. A. Improved animal rotavirus isolation in ma104 cells using different trypsin concentrations. **Arq Inst Biol**, v.71, n.4, p.437-441, 2004.

ROUGEMONT, A.; KAPLON, J.; PILLET, S.; MORY, O.; GAGNEUR, A.; MINOUI-TRAN, A.; MERITET, J. F.; MOLLAT, C.; LORROT, M.; FOULONGNE, V.; GILLET, Y.; NGUYEN BOURGAIN, C.; ALAIN, S.; AGIUS, G.; LAZREK, M.; COLIMON, R.; FONTANA, C.; GENDREL, D.; POTHIER, P. Molecular and Clinical Characterization of Rotavirus From Diarrheal Infants Admitted to Pediatric Emergency Units in France. **Pediatr Infect Dis J**, v.30, n.2, p.118-124, 2011.

RUIZ-PALACIOS, G. M.; PEREZ-SCHAEL, I.; VELAZQUEZ, F. R.; ABATE, H.; BREUER, T.; CLEMENS, S. C.; CHEUVART, B.; ESPINOZA, F.; GILLARD, P.; INNIS, B. L.; CERVANTES, Y.; LINHARES, A. C.; LÓPEZ, P.; MACÍAS-PARRA, M.; ORTEGA-BARRÍA, E.; RICHARDSON, V.; RIVERA-MEDINA, D. M.; RIVERA, L.; SALINAS, B.; PAVÍA-RUZ, N.; SALMERÓN, J.; RÜTTIMANN, R.; TINOCO, J. C.; RUBIO, P.; NUEZ, E.; GUERRERO, M. L.; YARZÁBAL, J. P.; TORNIEPORTH, N.; SÁEZ-LLORENS, X.; VERGARA, R. F.; VESIKARI, T.; BOUCKENOOGHE, A.; CLEMENS, R.; DE VOS, B.; O'RYAN, M.; FOR THE HUMAN ROTAVIRUS VACCINE STUDY GROUP\*. The new attenuated human rotavirus vaccine is safe and highly protective against severe rotavirus gastroenteritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled multinational trial. **N Engl J Med**, v.354, p.11-22, 2006.

RUUSKA, T.; VESIKARI, T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical diarrhoeal episodes. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.22, p.259-67, 1990.

SÁFADI, M. A. P.; BEREZIN, E. N.; MUNFORD, V.; ALMEIDA, F. J.; MORAES, J. C.; PINHEIRO, C. F.; RÁCZ, M. L. Hospital-based surveillance to evaluate the impact of rotavirus vaccination in São Paulo, Brazil. **Pediatr Infect Dis J**, v.29, n.11, 2010.

SAITOH, Y.; MATSUNO, S.; MUKOYAMA, A. Exanthem subitum and rotavirus. **N Engl J Med**, v.304, p.845, 1981.

SANTOS, J. S.; ALFIERI, A. F.; LEITE, J. P. G.; SKRABA, I.; ALFIERI, A. A. Molecular epidemiology of the human group A rotavirus in the Paraná State, Brazil. **Braz Arch Biol Technol**, v.51 n.2, p.287-294, 2008.

SANTOS, N. S. O. Víruses entéricas. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.59-74.

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

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

SANTOS, N.; SOARES, C. C.; VOLOTÃO, E. M.; ALBUQUERQUE, M. C. M.; HOSHINO, Y. Surveillance of rotavirus strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999. **J Clin Microbiol**, v.7, p.3399-3402, 2003.

SATO, K.; INABA, Y.; SHINOZAKI, T.; FUJII, R.; MATUMOTO, M. Isolation of human rotavirus in cell cultures. **Arch Virol**, v.69, p.155-60, 1981.

SAULSBURY, F.T.; WINKELSTEIN, J. A.; YOLKEN, R. H. Chronic rotavirus infection in immunodeficiency. **J Pediatr**, v.97, n.1, p.61-5, 1980.

SCHUMANN, T.; HOTZEL, H.; OTTO, P.; JOHNE, R. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. **Virology**, v.386, n.2, p.334-43, 2009.

SERRAVALLE, K.; SANTOS, N.; SARDI, S. I.; SILVA, S. P. S.; RIBEIRO JUNIOR, H. C.; MATTOS, A. P.; CAMPOS, G. S. Molecular characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Salvador, Bahia, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v.11, n.1, p.35-9, 2007.

SILVA, M. L.; SOUZA, J. R.; MELO, M. M. M. Prevalência de Rotavírus em crianças atendidas na rede pública de saúde do estado de Pernambuco. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.43, p.548-51, 2010.

SIMONSEN, L.; VIBOUD, C.; ELIXHAUSER, A.; TAYLOR, R.J.; KAPIKIAN, A.Z. More on RotaShield and intussusception: the role of age at the time of vaccination. **J Infect Dis**, v.192, suppl 1, p.36-43, 2005.

SOARES, L. S.; MASCARENHAS, J. D. P.; GABBAY, Y. B.; GUSMÃO, R. H. P.; LINHARES, A. C. Molecular characterization of G1 human rotaviruses. **Rev Pan-Amaz Saude**, v.1, n.1, p.125-30, 2010.

SOLBERG, O. D.; HASING, M. E.; TRUEBA, G.; EISENBERG, J. N. Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus. **Virology**, v.385, n.1, p.58-67, 2009.

SOUZA, D. F. KISIELIUS, J. J.; UEDA, M.; GABBAY, Y. B.; CARMONA, R. C. C.; TIMENETSKY, M. C. T. S. T.; MASCARENHAS, J. D. P.; TAKIMOTO, S.; TANAKA, H. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among adults living in Valentim Gentil, São Paulo state, Brazil. **J Diarrhoeal Dis Res**, v.16, n.2, p.59-65, 1998.

SOUZA, M. B. L. D. **Caracterização sorológica e molecular de amostras de Rotavirus A proveniente de amostras fecais de crianças com gastroenterite aguda em Goiânia-GO**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2001.

SOUZA, M. B.; RACZ, M. L.; LEITE, J. P.; SOARES, C. M.; MARTINS, R. M.; MUNFORD, V.; CARDOSO, D. D. Molecular and serological characterization of group a rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Goiania, Brazil, 1998-2000. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.22, n.7, p.441-3. 2003.

STEELE, A. D.; WILLIAMS, M. M.; BOS, P.; PEENZE, I. Comparison of two rapid enzyme immunoassays with standard enzyme immunoassay and latex agglutination for the detection of human rotavirus. **J Diarrhoeal Dis Res**, v.12, p.117-20, 1994.

STEWIEN, K. E.; da CUNHA, L. C.; ALVIM, A. C.; REIS-FILHO, A. S.; ALVIM, M. A.; BRANDÃO, A. A.; NEIVA, M. N. Rotavirus associated diarrhea during infancy in the city of S. Luis (MA), Brazil: a two-year longitudinal study. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.33, n.6, p.459-64, 1991.

TEIXEIRA, J. M.; CAMARA, G. N. N. L.; PIMENTEL, P. F. V.; FERREIRA, M. N. R.; FERREIRA, M. S. R.; ALFIERI, A. A.; GENTSCH, J. R.; J.P.G. LEITE, J. P. G. Human group C rotavirus in children with diarrhea in the Federal District, Brazil, **Braz J Med Biol Res**, v.31, n.11, p.1397-1403, 1998.

THOMAS, E. E.; PUTERMAN, M. L.; KAWANO, E.; CURRAN, M. Evaluation of seven immunoassays for detection of rotavirus in pediatric stool samples. **J Clin Microbiol**, v.26, p.1189-93, 1988.

THURET, A.; PATURAL, H.; BERTHELOT, P.; BENZAIT, F.; MARTIN, I.; JUSOT, J. F.; TEYSSIER, G.; FABRY, J.; POZETTO, B. Prospective follow-up of hospital-acquired diarrhoea in 28 paediatric wards of the south-east part of France during a winter season. **Pathol Biol (Paris)**, v.52, p.131-7, 2004.

TIMENETSKY, M. C. S. T.; GOUVEA, V.; SANTOS, N.; CARMONA, R. C. C.; HOSHINO, Y. A novel human rotavirus serotype with a dual G5-G11 specificity. **J Gen Virol**, v.78, n.6, p.1373-8, 1997.

TIMENETSKY, M. C. S. T.; SANTOS, N.; GOUVEA, V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. **J Clin Microbiol**, v.32, n.10, p.2622-4, 1994.

TROJNAR, E.; OTTO, P.; JOHNE, R. The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains. **Virology**, v.386, n.2, p.325-33, 2009.

TSUGAWA, T.; HOSHINO, Y. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. **Virology**, v.230, n.2, p.344-53, 2008.

URSU, K.; KISFALI, P.; RIGÓ, D.; IVANICS, E.; ERDELYI, K.; DAN, A.; MELEGH, B.; MARTELLA, V.; BÁNYAI, K. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. **Arch Virol**, v.154, n.8, p.1365-9, 2009.

van REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In: **Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego, Calif.: Academic Press, 2000. p.395-433.

VELASQUEZ, F. R.; MATSON, D. O.; GUERRERO, M. L.; SHULTS, J.; CALVA, J. J.; MORROW, A. L.; GLASS, R. I.; PICKERING, L. K.; RUIZ-PALACIOS, G. M. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. **J Infect Dis**, v.182, p.1602-1609, 2000.

VESIKARI, T.; ISOLAURI, E.; DELEM, A.; D'HONDT, E.; ANDRÉ, F. E.; BEARDS, G. M.; FLEWETT, T. H. Clinical efficacy of the RIT 4237 live attenuated bovine rotavirus vaccine in infants vaccinated before a rotavirus epidemic. **J Pediatr**, v.107, p.189-94, 1985.

VESIKARI, T.; ISOLAURI, E.; DELEM, A.; D'HONDT, E.; ANDRÉ, F. E.; ZISSIS, G. Immunogenicity and safety of live oral attenuated bovine rotavirus vaccine strain RIT 4237 in adults and young children. **Lancet**, v.2, n.8354, p.807-11, 1983.

VESIKARI, T.; MATSON, D. O.; DENNEHY, P.; VAN DAMME, P.; SANTOSHAN, M.; RODRIGUEZ, Z. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant vaccine. **N Engl J Med**, v.354, p.23-33, 2006.

VESIKARI, T.; KARVONEN, A.; PRYMULA, R.; SCHUSTER, V.; TEJEDOR, J. C.; THOLLOT, F.; GARCIA-CORBEIRA, P.; SILVIA DAMASO, S.; HAN, H. H.; BOUCKENOOGHE, A. Immunogenicity and safety of the human rotavirus vaccine Rotarix™ co-administered with routine infant vaccines following the vaccination schedules in Europe. **Vaccine**, v.28, p.5272-9, 2010.

VOLOTÃO, E. M.; SOARES, C. C.; MARANHÃO, A. G.; ROCHA, L. N.; HOSHINO, Y.; SANTOS, N. Rotavirus Surveillance in the City of Rio de Janeiro-Brazil During 2000-2004: Detection of Unusual Strains With G8P[4] or G10P[9] Specificities. **J Med Virol**, v.78, p.263-72, 2006.

WANG, F. T.; MAST, T. C.; GLASS, R. J.; LOUGHLIN, J.; SEEGER, J. D. Effectiveness of the Pentavalent Rotavirus Vaccine in Preventing Gastroenteritis in the United States. **Pediatrics**, v.125, n.2, p.e208-e213, 2010.

WARD, R. L. Mechanisms of protection against rotavirus in humans and mice. **J Infect Dis**, v.174, suppl 1, p.S51-S58, 1996.



WARD, R. L.; BERNSTEIN, D. I.; YOUNG, E. C.; SHERWOOD, J. R.; KNOWLTON, D. R.; SCHIFF, G. M. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. **J Infect Dis**, v.154, n.5, p.871-80, 1986.

WIDDOWSON, M. A.; van DOOMUN, G. J.; van der POEL, W. H.; de BOER, A. S.; MAHDI, U.; KOOPMANS, M. Emerging group A rotavirus and nosocomial outbreak of diarrhoea. **Lancet**, v.356, n.9236, p.1161-2, 2000.

WILDE, J.; YOLKEN, R.; WILLOUGHBY, R.; EIDEN, J. Improved detection of rotavirus shedding by polymerase chain reaction. **Lancet**, v.337, p.323-6, 1991.

YOLKEN, R.; WILDE, J. Assays for detecting human rotavirus. In: KAPIKIAN, A. Z. (Ed.). **Viral Infections of the Gastrointestinal Tract**. New York: Marcel Dekker, 1994. p.251-78.

YOSHIDA, A.; KAWAMITU, T.; TANAKA, R.; OKUMURA, M.; YAMAKURA, S.; TAKASAKI, Y.; HIRAMATSU, H.; MORNOL, T.; LIZUKA, M.; NAKAGOMI, O. Rotavirus encephalitis: detection of the virus RNA in the cerebrospinal fluid. **Pediatr Infect Dis J**, v.14, p.914-6, 1995.

ZÁRATE, S.; ESPINOSA, R.; ROMERO, P.; GUERRERO, C. A.; ARIAS, C. F.; LÓPEZ, S. Integrin  $\alpha 2\beta 1$  Mediates the Cell Attachment of the Rotavirus Neuraminidase-Resistant Variant nar3. **Virology**, v.278, 50-54, 2000.

ZENG, S. Q.; HALKOSALO, A.; SALMINEN, M.; SZAKAL, E. D.; PUUSTINEN, L.; VESIKARI, T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroen- teritis. **J Virol Methods**, v.153, p.238-40, 2008.

ZHAORI, G.T.; FU, L.T.; XU, Y.H.; GUO, Y.R.; PENG, Z. J.; SHAN, W.S. Detection of rotavirus antigen in tracheal aspirates of infants and children with pneumonia. **Chin Med J (Engl)**, v.104, p.830-3, 1991.

ZHENG, B. J.; CHANG, R. X.; MA, G. Z.; XIE, J. M.; LIU, Q.; LIANG, X. R.; NG, M. H. Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. **J Med Virol**, v.34, p.29-37, 1991.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE 1

### PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE ROTAVÍRUS



**Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná**  
**Unidade de Apoio Diagnóstico**  
 Serviço de Análises Clínicas - Serviço de Anatomia Patológica

Técnico: \_\_\_\_\_

Data da Extração do cDNA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### MÉTODO: ENZIMA SUPERSRIPT™ – REVERSE TRANSCRIPTASE (INVITROGEN)

- 6µL do RNA extraído
- 1µL de cada primer específico (o primer está a 20 pmol por µL)
  - ❖ para VP4 – 4 con 2 e 4 con 3
  - ❖ para VP7 – 9 con 1 e 9 con 2
- 4µL de dNTPs 1,25 mM
- Incubar a 65° (termobloco) por 5 minutos e colocar rapidamente no gelo
- Adicione 8µL do **MIX para cDNA**
- Incubar a 42° por 50 minutos
- Incubar a 70° por 15 minutos para inativar a reação

#### MIX PARA cDNA

Reagentes	1 amostra	2 amostras	3 amostras
5X buffer	4µL	8µL	12µL
0,1 M DTT	2µL	4µL	6µL
RNAse OUT(40U/µL)	1µL	2µL	3µL
SuperScript™	0,5µL	1µL	1,5µL
H <sub>2</sub> O DNase/RNAse free	0,5µL	1µL	1,5µL

**APÊNDICE 2**  
**PROTOCOLO DE RT-PCR PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA VP7 DOS RV**



**Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná**  
**Unidade de Apoio Diagnóstico**  
 Serviço de Análises Clínicas - Serviço de Anatomia Patológica

DATA DO PCR 1: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

**MIX RT- PCR- VP7**

Reagentes		Volume por reação	
10x PCR Buffer		2,5µL X _____	=
MgCl <sub>2</sub> 50mM		1,0µL X _____	=
1.25 dntp's		4µL X _____	=
Iniciadores consensuais G (9 con 1)		1µL X _____	=
Iniciadores consensuais G (9 con 2)		1µL X _____	=
Platinum TaqDNA Polimerase 5U/µL		0,25µL X _____	=
H <sub>2</sub> O DNase/RNase free q.s.p		22,5µL	
Volume do cDNA		2,5µL	
<b>Ciclos</b>		1 x 94°C – 3' 40 x 94°C – 45" 40 x 45°C – 45" 40 x 72°C – 1' 2 Hold 72° 4°C - ∞	
N.º das amostra	N.º das amostra	Posição gel	Posição gel
1-	6-	1-	6-
2-	7-	2-	7-
3-	8-	3-	8-
4-	9-	4-	9-
5-	10-	5-	10-

- Analisar em gel de agarose a 1%
- Brometo de Etidium 1 µL
- Aplicar no gel: 5µL amostra + 4µL H<sub>2</sub>O + 1µL Tampão de amostra.
- Peso molecular: 1 Kb, Corrida 100V, por 45'.
- Produto Esperado: 904pb.

**APÊNDICE 3**  
**PROTOCOLO DE *nested* RT-PCR PARA**  
**DETECÇÃO DA PROTEÍNA VP7 DOS RV**



**Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná**  
**Unidade de Apoio Diagnóstico**  
 Serviço de Análises Clínicas - Serviço de Anatomia Patológica

DATA DO PCR 2: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

**MIX Nested - PCR- VP7**

Reagentes	Volume por reação
10x PCR Buffer	2.5µL X _____ =
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1,0µL X _____ =
1.25 dntp's	4µL X _____ =
Iniciadores consensuais G Pool C - 9T1-1, 9T1-2, 9T-3P, 9T-4, FT-5 Pool D - HT8, 9T-9B, ET-10 Pool E - DT6, BT-11	1µL X _____ =
Iniciadores consensuais G (9 con 1)	1µL X _____ =
Platinum TaqDNA Polimerase 5U/µL	0,25µL X _____ =
H <sub>2</sub> O DNase/RNase free q.s.p	( ) 24µL ( ) 21µL
Volume do PCR 1	( ) 1µL ( ) 4µL
<b>Ciclos</b>	1 x 94°C – 3' 40 x 94°C – 1' 55°C – 2' 72°C – 1' 2 Hold 72°C – 10' 4°C - ∞

N.º das amostra	N.º das amostra	Posição gel	Posição gel
1-	5-	1-	5-
2-	6-	2-	6-
3-	7-	3-	7-
4-	8-	4-	8-

- Analisar em gel de agarose a 1% / Brometo de Etidium 1 µL
- Aplicar no gel: 5µL amostra + 4µL H<sub>2</sub>O + 1µL Tampão de amostra.
- Peso molecular: 1 Kb, Corrida 100V, por 45'.
- Produto Esperado: Pool C: 158pb (G1); 244pb (G2); 466pb (G3); 403pb (G4); 742pb (G5);  
 Pool D: 274pb (G8); 110pb(G9); 715pb (G10);  
 Pool E: 500pb (G6); 337pb (G11).

**APÊNDICE 4**  
**PROTOCOLO DE RT-PCR PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA VP4 DOS RV**



**Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná**  
**Unidade de Apoio Diagnóstico**  
 Serviço de Análises Clínicas - Serviço de Anatomia Patológica

DATA DO PCR 1: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

**MIX RT- PCR- VP4**

Reagentes		Volume por reação			
10x PCR Buffer		2,5µL X _____ =			
MgCl <sub>2</sub> 50mM		1,0µL X _____ =			
1.25 dntp's		4µL X _____ =			
Iniciadores consensuais P (4 con 2)		1µL X _____ =			
Iniciadores consensuais P (4 con 3)		1µL X _____ =			
Platinum TaqDNA Polimerase 5U/µL		0,25µL X _____ =			
H <sub>2</sub> O DNase/RNase free q.s.p		22,5µL			
Volume do cDNA		2,5µL			
<b>Ciclos</b>		1 x 94°C – 3' 40 x 94°C – 45" 40 x 45°C – 45" 40 x 72°C – 1' 2 Hold 72° 4°C - ∞			
N.º das amostra	N.º das amostra	Posição gel		Posição gel	
1-	6-	1-		6-	
2-	7-	2-		7-	
3-	8-	3-		8-	
4-	9-	4-		9-	
5-	10-	5-		10-	

- Analisar em gel de agarose a 1%
- Brometo de Etidium 1 µL
- Aplicar no gel: 5µL amostra + 4µL H<sub>2</sub>O + 1µL Tampão de amostra
- Peso molecular: 1 Kb, Corrida 100V, por 45'.
- Produto Esperado: 876pb.

## APÊNDICE 5

### PROTOCOLO DE *nested* RT-PCR PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA VP4 DOS RV



**Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná**  
**Unidade de Apoio Diagnóstico**  
 Serviço de Análises Clínicas - Serviço de Anatomia Patológica

DATA DO PCR 2: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

#### MIX Nested - PCR- VP4

Reagentes		Volume por reação			
10x PCR Buffer		2,5µL X _____ =			
MgCl <sub>2</sub> 50mM		1,0µL X _____ =			
1.25 dntp's		4µL X _____ =			
Iniciadores consensuais P ( ) Pool A (1T-1, 2T-1, 3T-1, 4T-1) ( ) pNCDV		1µL X _____ =			
Iniciadores consensuais P ( ) 4 con 3 ( ) 4 con 2		1µL X _____ =			
Platinum TaqDNA Polimerase 5U/µL		0,25µL X _____ =			
H <sub>2</sub> O DNase/RNase free q.s.p		( ) 24µL ( ) 21µL			
Volume do PCR 1		( ) 1µL ( ) 4µL			
<b>Ciclos</b>		1 x 94°C – 3' 40 x 94°C – 1' 55°C – 2' 72°C – 1' 2 Hold 72°C – 10' 4°C - ∞			
N.º das amostra	N.º das amostra	Posição gel		Posição gel	
1-	5-	1-		5-	
2-	6-	2-		6-	
3-	7-	3-		7-	
4-	8-	4-		8-	

- Analisar em gel de agarose a 1%
- Brometo de Etidium 1 µL
- Aplicar no gel: 5µL amostra + 4µL H<sub>2</sub>O + 1µL Tampão de amostra.
- Peso molecular: 1 Kb, Corrida 100V, por 45'.
- Produto Esperado: Pool A: 345pb(P[8]); 483pb (P[4]); 267pb(P[6]); 391pb (P[9]); P[1]: 622pb

**APÊNDICE 6**  
**FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS CLÍNICOS EPIDEMIOLÓGICOS (1/1)**

**PACIENTES PEDIÁTRICOS/AMBULATORIAIS**

**I - IDENTIFICAÇÃO:**

Data do início dos sintomas:

|\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

Data do internamento:

|\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|

Unidade de internamento:

|\_|\_| UTI    |\_|\_| Ped. ambulatório    |\_|\_| Emergência pediátrica

|\_|\_| infecto pediátrica    |\_|\_| outra: \_\_\_\_\_

Tempo de internamento: \_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_

Sexo ( ) masculino    ( ) feminino    Óbito ( )

Idade ( ) 0 - 6 meses    ( ) 7- 12 meses    ( ) 13-24 meses    ( ) > 24 meses

Febre ( )    Vômito ( )    Anorexia ( )

DEEC ( ) sim    ( ) não    Quanto ( percentual) \_\_\_\_\_

N.º de Leucócitos: \_\_\_\_\_ N.º Linfócitos/bastonetes: \_\_\_\_\_

Gasometria: \_\_\_\_\_ Na: \_\_\_\_\_ K: \_\_\_\_\_

Resultado do exame Parasitológico: \_\_\_\_\_

Sg.oculto ( )    pesq.leucócitos ( )    gordura neutra ( )    subst. redutoras ( )

N.º de evacuações por dia: \_\_\_\_\_

Resultado de Coprocultura: \_\_\_\_\_

Tipo de Rehidratação: \_\_\_\_\_

Antibioticoterapia ( ) sim    ( ) não

Qual: \_\_\_\_\_

Evolução: |\_|\_| cura    |\_|\_| óbito    |\_|\_|

Complicações: \_\_\_\_\_



**APÊNDICE 7**  
**ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO**

Running title: Rotavirus diagnosis and impact of vaccination

**Rotavirus infection in a tertiary hospital: laboratory diagnosis and  
impact of immunization on pediatric hospitalization**

Luciane Aparecida Pereira<sup>1</sup>, Sonia M. Raboni<sup>1\*</sup>, Meri B. Nogueira<sup>1</sup>, Luine R.  
Vidal<sup>1</sup>, Sergio M. de Almeida<sup>1</sup>, Maria C. Debur<sup>2</sup>, Cristina Cruz<sup>1</sup>,

<sup>1</sup> Laboratory of Virology, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

<sup>2</sup> Central Laboratory of Public Health, Secretaria do Estado do Paraná, Curitiba, Brazil.

\*Correspondence to: Sonia Mara Raboni

Laboratório de Virologia, Hospital de Clínicas, UFPR

Rua Padre Camargo, 280, 2<sup>nd</sup> floor, Room 202

Alto da XV, Curitiba, Paraná, Brazil

ZIP Code: 82060-240

Phone: 55 41 3360-7974 FAX: 55 41 3360-1811

e.mail: [sraboni@ufpr.br](mailto:sraboni@ufpr.br)

SMR is a CNPq fellowship

**Key words:** Rotavirus, diarrhea, enzyme immunoassay, latex particle agglutination, PAGE, vaccine.

## **ABSTRACT**

Rotavirus (RV) is the main etiological agent of diarrhea in children; its laboratory diagnosis is fundamental to guide the clinical conduct and prevent its spread. RV immunization was introduced in Brazilian 6-month-old children in 2006. The present study was aimed to evaluate three methodologies used for human RV detection in stool specimens obtained from patients hospitalized for gastroenteritis in a teaching hospital and report the impact of RV immunization in hospitalization by diarrhea. 293 stool samples collected in the 2001-2008 period were analyzed by enzyme immunoassay (EIA), latex agglutination (LA) and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Rotavirus was detected in 34.8% of samples by LA assay, 28.3% of samples by EIA assay and in 25.6% of samples by PAGE assay. Considering the PAGE method as gold standard, the sensitivity, specificity and accuracy of EIA were 94.6%, 94.4% and 94.5%, and to AL were 82.6%, 81.6% and 81.9%, respectively. These results indicate that antigen detection by EIA is a rapid, sensitive and specific method, and could be used in large-scale applications for the screening of stool suspected of RV infection. This study showed decreased incidence of RV infection in hospitalized children prior to the implementation of the national immunization program against RV.

## INTRODUCTION

Diarrhea is a leading cause of deaths in children despite the decline in mortality observed over the past few years.<sup>1,2</sup> Rotavirus (RV) is the most important etiological agent of diarrhea in children under five years old, and accounts for 111 million episodes of gastroenteritis in the world, and by approximately 611,000 deaths annually, mainly in developing countries.<sup>2</sup> In Brazil, several studies were conducted to demonstrate the importance of RV in children morbidity and mortality.<sup>3,4,5,6,7,8,9,10</sup>

The rotavirus belongs to the *Reoviridae* family, exhibits icosahedral symmetry, it's not enveloped and was first identified by electron microscopy by Bishop *et al.*, 1973.<sup>11</sup> The viral particle consists of three layers of protein and the viral genome consists of 11 segments of double-stranded RNA (RNA d.f.), which encode six structural proteins, VP1-4, VP6 and VP7 and six non-structural proteins, NSP1-6.<sup>12,13</sup> The VP6 protein, located in the inner capsid of the virus contains the antigenic determinants, which allow their classification into seven serogroups of A to G, with group A being the most common agent of diarrhea in infancy.<sup>2,6,13,14</sup> RV infection can range from mild diarrhea, with limited duration, to a severe case, with fever, vomiting and dehydration.<sup>15,16,17</sup>

Laboratory diagnosis of rotavirus infection are usually performed by antigen detection, using enzyme immunoassay<sup>15</sup> or latex agglutination (LA) techniques, which have a sensitivity and specificity above 90%. Molecular techniques such as polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) are applied to determine the RNA migration patterns and virus genotyping, respectively.<sup>18,19,20,21</sup>

In 2006, the RV vaccine was introduced by the Brazilian National Immunization Program for children younger than six months, since then, the impact of this immunization has been analyzed by monitoring the decrease of children hospitalization by gastroenteritis and by laboratorial surveillance based on viral antigen tests results.<sup>22</sup> The virology laboratory of Hospital de Clínicas of the Federal University of Paraná (HC-UFPR), a teaching hospital, has detected this virus in children hospitalized by gastroenteritis; Screening by antigen detection using EIA or LA methods was carried out, followed by PAGE techniques to viruses profile analysis, positive samples for the detection of viral antigens are notified and sent to reference laboratories for genetic characterization. The results of these laboratory

screening tests and the impact of the immunization on the incidence of RV infection in children admitted to the Clinical Hospital-UFPR were presented in this study.

## **MATERIALS AND METHODS**

Stool samples from patients with acute gastroenteritis admitted to the HC-UFPR from April 2001 to December 2008 were analyzed using the LA, EIA for antigen detection and PAGE for RNA detection methods.

The stool samples were collected in plastic vials without preservatives and sent to the virology laboratory immediately after collection. The samples were then processed or stored at -20°C for as long as 24 hours before processing.

EIA was performed using Rotascreen II kit<sup>®</sup> (Rotascreen II-Microgen-Bioproducts- Camberley, U.K.) or EIARA kit (Immunoassay for rotavirus and adenovirus-Biomanguinhos, RJ, Brazil). Latex agglutination was carried out using Virotest kit<sup>®</sup> (Omega Diagnostics, Scotland, United Kingdom) or Rotascreen<sup>®</sup> Kit (Rotascreen-Microgen-Bioproducts, Camberley, U.K). Both methods were performed according to the manufacturer's instructions. All tests kits cover all the requirements of the Brazilian Sanitary Surveillance Agency (ANVISA) for use in laboratory diagnosis. Furthermore, they were validated by the local virology laboratory, where the analysis of a previously characterized group of samples was carried out.

PAGE was standardized using the method previously reported by Boom et al. (1990)<sup>23</sup> with some modifications for the extraction of viral RNA and separation of genomic segments.<sup>24</sup> The RNA was loaded onto a polyacrylamide discontinuous gel (7.5% -separator and 3.5% - concentrator) for 2 hours at 100V. The gel was stained with silver nitrate using the method of Herring et al.<sup>25</sup> RNA extracted from simian RV (SA11) was used as positive control on PAGE analysis.

### **Statistical Analysis**

Descriptive analysis was performed for all the variables. Data were compiled and analyzed using JMP Software Version 5.2.1. Sensitivity, specificity, accuracy, likelihood ratios (LRs), positive and negative predictive values were calculated using binomial exact methods. According to these calculations, a specimen was considered to contain the rotavirus when it was positive by PAGE (gold standard). Agreement between the assays was evaluated using Kappa coefficient. Kappa values above

0.75 indicate strong agreement; values between 0.40 and 0.75 represent fair to good agreement and values below 0.40 reflect poor agreement. Correlation between EIA, LA and PAGE was analyzed using the Spearman correlation coefficient. The differences between groups were analyzed using Chi-square test or Fisher's exact test, as appropriate. All tests were over two-tails. A  $p$  value of  $< 0.05$  was considered statistically significant.

### **Ethics**

The procedures involving the use of the bank of clinical samples from the laboratory of virology for the detection of RV in human stool samples had the approval of the Committee on the Ethics of Research on Human Beings of the HC-UFPR, under registration number 4441.023/2002-04.

### **RESULTS**

A total of 293 fecal samples collected from 286 children with acute gastroenteritis were analyzed. The rotavirus antigen was detected in 34.8% (102/293) of the samples by LA, 28.3% (83/293) by EIA and in 25.5% (75/293) by PAGE.

Figure 1 shows the distribution of positive samples by different laboratory tests and the total amount of samples collected each year. Overall, there was a good correlation between the tests, though not for all the years of the study. Significant differences between the results were observed in 2007 when all samples were positive only by latex agglutination, determining false positive results. A decline in the number of patients positive for rotavirus has been observed since 2004, two years before the vaccine introduction.

Compared to PAGE, EIA presented 94.6%, 94.4% and 94.5% of sensitivity, specificity and accuracy, respectively. The positive predictive value was 85.5% and the negative predictive value was 98%. The sensitivity, specificity and accuracy of the LA test were respectively 82.6%, 81.6% and 81.9%. The positive predictive value was 60.7% and the negative predictive value was 93.1%. Considering all the results obtained, the degree of agreement of the tests (Kappa measures) was 0.86 and 0.57 for EIA and LA, respectively. The likelihood ratio values of EIA (LR+ and LR-) demonstrated that, unlike LA, test results were essential to help confirm diagnosis.

There was no statistically significant difference in the results obtained between PAGE and EIA ( $p = 0.51$ ), the opposite was observed comparing the results between PAGE and LA ( $p = 0.018$ ).

Figure 2 shows the contingency table obtained by comparison of the results of EIA and LA with PAGE results, and the summary of the operational characteristics of the tests of rotavirus antigen detection.

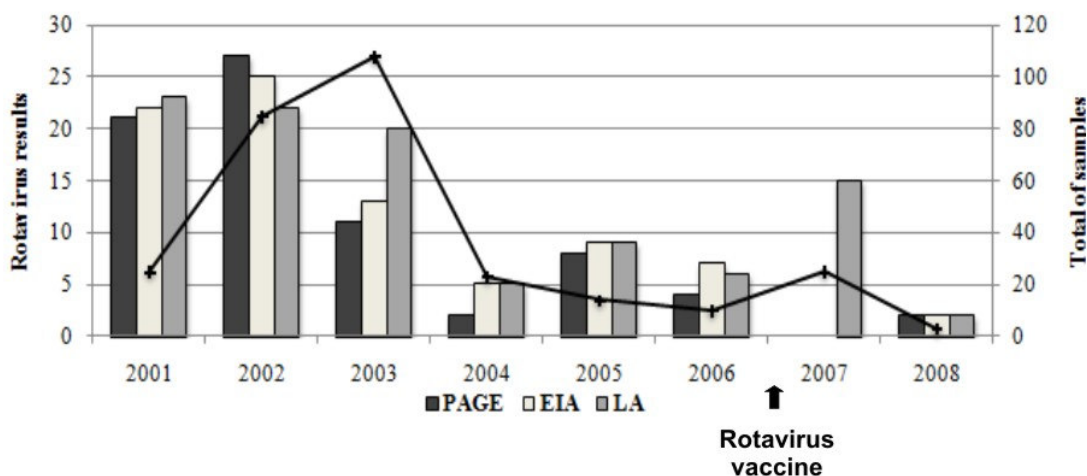


Figure 1. Rotavirus positive results and number of samples studied, 2001-2008.

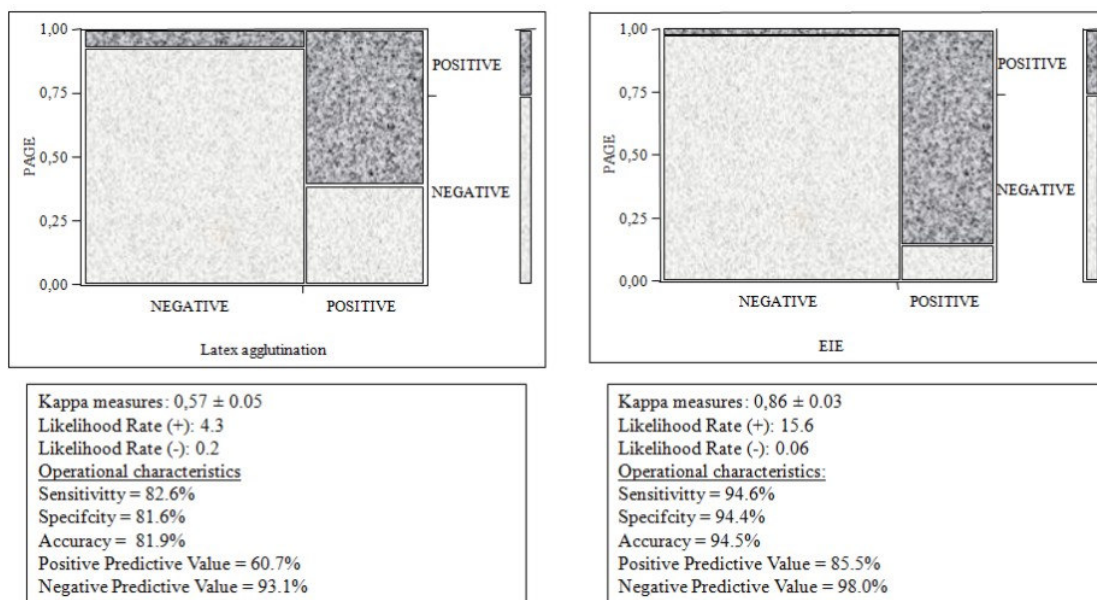


Figure2. Rotavirus diagnosis – Contingency table and operational characteristics of antigen detection tests

## DISCUSSION

Several decades after the description of the rotavirus, many studies have been carried out to compare detection techniques.<sup>19,26,27,28,29,30,31</sup> Currently, various commercial tests are available from those based on less laborious techniques that enable a quick diagnosis, e.g. antigen detection methods, to more complex tests such as the polymerase chain reaction.<sup>32,33,34</sup>

In this study, we evaluated different antigen detection tests for establishing the diagnosis of rotavirus infection in samples from children with gastroenteritis. A prevalence of diarrhea associated with RV of 25.6% (75/293) similar to that reported in Brazil<sup>35,36</sup> and in other countries<sup>37,38</sup> was found. PAGE is an important tool to understand the epidemiology of RV and it was chosen as the gold standard test due to its specificity and practicability and also, because it detects non-A RV.<sup>39,40,41</sup> However, its use as screening test is not recommended due to the need for technical training for its implementation and longer time of execution.<sup>42</sup> Some positive results to antigen detection by EIA and LA were found, though with negative results by PAGE. It is important to mention that the antigen detection tests using PAGE were carried out at different moments, and the samples were frozen at -70 °C for different periods, which may have affected PAGE results.

There was no significant difference between the EIA and PAGE methods. The positive and negative likelihood ratio showed that EIA positive and negative results can be used to confirm diagnosis of rotavirus infection. These results indicate that EIA assay is as sensitive and specific as the PAGE method, and could be applied on a large scale from the screening of stool suspected of rotavirus diarrhea, having a good correlation with the disease.<sup>21,34,43,44</sup>

The degree of agreement of the tests analyzed by Kappa measures in the results between LA and PAGE showed regular/good agreement, demonstrating low sensitivity for latex agglutination test like other studies.<sup>20,45,46,47</sup> Regarding specificity, some authors report that, unlike our findings, they have found values above 90%, where the specificity obtained in this study was 81.9%.<sup>42,48</sup> In general, the results obtained by PAGE and EIA had strong agreement, unlike the findings for PAGE and AL. Recent reports show that the performance of commercially available latex agglutination tests compares favorably to virus isolation and ELISA.<sup>49</sup> Nevertheless, in this study, the variability observed in LA results for some years has strongly jeopardized its reliability as a screening test. Thus, it has not been possible to predict

the occurrence (or non-occurrence) of the disease based on LA results. Although this technique may be useful in certain situations, such as outbreaks of the disease, or in locations with lack of resources for RV detection, because it is fast, practical and has low cost.<sup>31,50</sup>

A different distribution of positive samples was observed using this method in different years, with a progressive decrease in the number of samples investigated since 2004. A study to assess the impact of vaccination against the rotavirus has been previously conducted by our institution. The number of outpatient appointments and hospital admissions for gastroenteritis before and after the implementation of vaccine (2005 and 2007) was assessed. That study showed a reduction of 54.2% and 39.4% of medical appointments for children less than 12 months old and 12 to 60 months old respectively. Furthermore, there was also a reduction of 43.9% and 33.3% of hospital admissions for gastroenteritis in children less than 12 months old and 12 to 60 months old, respectively, considering vaccination coverage around 80% in the referred period.<sup>51</sup>

The decline in the number of positive cases observed in this study, before vaccine implementation, can be explained by the improvement of sanitation conditions (access of the poorest populations of the region to safe sanitation) and also by the achievement of public health politics based on the availability of primary care at health units and by the policy of the teaching hospital of referring severe cases to tertiary care.

Despite the fact that the vaccination program is being implemented on a continuous basis and its initial impact on the reduction of cases of rotavirus infection, we found that hospital admissions for severe cases of the infection persist in the tertiary hospital. This can be explained by the occurrence of the disease in patients with risk factors who did not respond to vaccine or were not vaccinated. Therefore, it is essential to proceed with laboratory diagnosis of this disease, as well as to monitor viral genetic variability, which could influence the response to immunization.

RV vaccines have been introduced in Brazilian Immunization Calendar and the surveillance has been made by laboratory diagnosis using antigen detection methods. It is important to determine the performance of these methods in order to know how these can influence the data obtained and try to maintain a homogenous guidelines laboratory tests in all public laboratories. Concerning the methodologies employed to RV diagnosis, the results of this study stress the need for constant



evaluations of the performance of RV detection tests due to the great availability of kits in the market.

## CONCLUSION

A few laboratories in Brazil perform testing to diagnosis RV infection, and there is not a standardization of what methods should be used. These results indicate that antigen detection by LA has higher sensitivity, but lower specificity than EIA, which is a rapid, sensitive and specific method, and could be used in large-scale applications for the screening of stool suspected of RV infection. EIA would provide the most appropriate information to monitoring RV infection, and consequently yield the clearest baseline information to assess immunization response.

We declare that we have no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Costa FF, Carmona RC, Timenetsky MC. Characterization of rotavirus strains from day care centers: pre- and post-rotavirus vaccine era. *J Pediatr (Rio J)* 2010; 86(2):155-158.
2. Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(2):304-306.
3. Kapikian A, Hoshino Y, Chanock R. Rotaviruses. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001
4. Linhares AC. Rotavirus Infection in Brazil: Epidemiology, Immunity, and Potential Vaccination. *Braz J Infect Dis* 1997; 1(6):284-293.
5. Mascarenhas JD, Gusmao RH, Barardi CR et al. Characterization of rotavirus P genotypes circulating among paediatric inpatients in northern brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1999. 41(3):165-170.
6. Meneghetti A, Bolognini A, Lauretti F, Linhares R, Santos N, Nozawa C. Incidence of group A rotavirus in urban and rural areas of the city of Londrina - Brazil, from 1995 to 1997. *Braz Arch Biol Technol* 2001; 44(3):257-261.
7. Richardson V, Hernandez-Pichardo J, Quintanar-Solares M et al. Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *N Engl J Med* 2010; 362(4):299-305.

8. Sartori AM, Valentim J, de Soarez PC, Novaes HM. Rotavirus morbidity and mortality in children in Brazil. *Rev Panam Salud Publica* 2008; 23(2):92-100.
9. Souza MB, Racz ML, Leite JP, Soares CM, Martins RM, Munford V, Cardoso DD. Molecular and serological characterization of group a rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Goiania, Brazil, 1998-2000. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003. 22(7):441-443.
10. Timenetsky MC, Santos N, Gouvea V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in Sao Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. *J Clin Microbiol* 1994; 32(10):2622-2624.
11. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 1993; 2(7841):1281-1283.
12. Desselberger U. Molecular epidemiology of rotaviruses. In: Farthing M, editor. *Viruses and the gut*. London: Swan. 1989.
13. Estes M. Rotaviruses and their replication. In: Knipe D, Howlwy P, editors. *Fields Virology*. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Willians & Wilkins. 2001.
14. Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 1989; 53(4):410-449.
15. Cauás R, Falbo A, Correia J, Oliveira K, Montenegro F. Diarréia por rotavírus em crianças desnutridas hospitalizadas no Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, IMIP. *Rev Bras Saude Mater Infant* 2006; 6:s77-s83.
16. Costa P, Grisi S, Cardoso D, Fiaccadori F, Souza M, Santos R. Clinical and epidemiological trends in rotavirus A infections. *Pediatrics (São Paulo)* 2004; 26(3):151-158.
17. Nunes A, Mello L, Parrode R, Bittar J. Prevalence of rotavirus in feces of children with acute diarrhea: clinical signs and associated symptoms. *Revista da AMRIGS* 2010; 54(2):147-151.
18. Beards GM, Campbell AD, Cottrell NR et al. Enzyme-linked immunosorbent assays based on polyclonal and monoclonal antibodies for rotavirus detection. *J Clin Microbiol* 1984.; 19(2):248-254.
19. Buesa J, Colomina J, Raga J, Villanueva A, Prat J. Evaluation of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT/PCR) for the detection of rotaviruses: applications of the assay. *Res Virol* 1996; 147(6):353-361.

20. Ferreira T, Becho M, Bernardo A et al. Performance of a latex agglutination test in the diagnosis of acute gastroenteritis by rotavirus. *Braz J Microbiol* 2006; 37(4):587-589.
21. Kasempimolporn S, Louisirochanakul S, Sinarachatanant P, Wasi C. Polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining for detection of rotavirus in stools from diarrheic patients in Thailand. *J Clin Microbiol* 1988; 26(1):158-160.
22. Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 2006; 354(1):11-22.
23. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28(3):495-503.
24. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680-685.
25. Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 1982; 16(3):473-477.
26. Bellamy K, Gardner PS, Hambling MH, Rice S, Bradburne AF. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human rotavirus in stools. *J Virol Methods* 1983; 7(2):65-72.
27. Berthiaume L, Alain R, McLaughlin B, Payment P, Trepanier P. Rapid detection of human viruses in faeces by a simple and routine immune electron microscopy technique. *J Gen Virol* 1981; 55(Pt 1):223-227.
28. Grauballe PC, Jarzabek Z. Comparison of indirect double antibody and double antibody sandwich ELISA techniques with latex agglutination test for the diagnosis of human rotavirus infection. *Acta Virol* 1984; 28(1):59-63.
29. Middleton PJ, Holdaway MD, Petric M, Szymanski MT, Tam JS. Solid-phase radioimmunoassay for the detection of rotavirus. *Infect Immun* 1977; 16(2):439-444.
30. Nakagomi O, Nakagomi A, Suto T et al. Detection of human rotavirus by reversed passive hemagglutination (RPHA) using antibody against a cultivable human rotavirus as compared with electron microscopy (EM) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Microbiol Immunol* 1982; 26(8):747-751.

31. Raboni SM, Nogueira MB, Hakim VM, Torrecilha VT, Lerner H, Tsuchiya LR. Comparison of latex agglutination with enzyme immunoassay for detection of rotavirus in fecal specimens. *Am J Clin Pathol* 2002; 117(3):392-394.
32. Carraro E, Perosa A, Siqueira I, Pasternak J, Martino M. Four kits evaluation for rotavirus rapid antigen detection in stool samples. *Rev Bras Anal Clin* 2008; 40(4):309-311.
33. Masendycz PJ, Palombo EA, Gorrell RJ, Bishop RF. Comparison of enzyme immunoassay, PCR, and type-specific cDNA probe techniques for identification of group A rotavirus gene 4 types (P types). *J Clin Microbiol* 1997; 35(12):3104-3108.
34. Momenzadeh A, Modarres S, Faraji A et al. Comparison of enzyme immunoassay, immunochromatography, and RNA-polyacrylamide gel electrophoresis for diagnosis of rotavirus infection in children with acute gastroenteritis. *Iran J med Sci* 2008; 33(3):173-176.
35. Linhares AC. Rotavirus infection in Brazil: epidemiology and challenges for its control. *Cad Saude Publica* 2000; 16(3):629-646.
36. Munford V, Souza E, Caruzo T, Martinez M, Rácz M. Serological and molecular diversity of human rotavirus in São Paulo, Brazil. *Braz J Microbiol* 2007; 38(3):459-466.
37. Bresee J, Fang ZY, Wang B et al. First report from the Asian Rotavirus Surveillance Network. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(6):988-995.
38. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(5):565-572.
39. Altindis M, Yavru S, Simsek A, Ozkul A, Ceri A, Koc H. Rotavirus infection in children with acute diarrhea as detected by latex agglutination, ELISA and polyacrylamide gel electrophoresis. *Indian Pediatr* 2004; 41(6):590-594.
40. Gomez JA, Bercovich JA, Grinstein S. Comparison of enzyme immunoassay, counterimmunoelectrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis for the diagnosis of rotaviruses. *Rev Argent Microbiol* 1985; 17(2):111-114.
41. Ibrahim OS, Sunderland D, Hart CA. Comparison of four methods for detection of rotavirus in faeces. *Trop Doct* 1990; 20(1):30-32.
42. Chakravarti A, Kumar S, Mittal SK, Broor S. Comparison of latex agglutination and polyacrylamide gel electrophoresis with enzyme linked immunosorbent assay for detecting human rotavirus in stool specimens. *Indian Pediatr* 1991; 28(5):507-510.

43. Brandt CD, Arndt CW, Evans GL et al.. Evaluation of a latex test for rotavirus detection. *J Clin Microbiol* 1987; 25(9):1800-1802.
44. Cornaglia E, Barrandeguy M, Fijtman N, Schudel A. Enzyme linked immunosorbent, immunofluorescence test and electrophoretic analysis of rotaviral RNA in the diagnosis and characterization of the bovine rotavirus. *Rev Latinoam Microbiol* 1989; 31(1):59-62.
45. Carducci A, Vannucchi R, Guidi M, Reali D, Ruschi MA. Human rotavirus detection in stool specimens using enzyme-linked immunosorbent assays and latex agglutination test. *Boll Ist Sieroter Milan* 1988; 67(3):241-244.
46. Dennehy PH, Gauntlett DR, Tente WE. Comparison of nine commercial immunoassays for the detection of rotavirus in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1988; 26(9):1630-1634.
47. Thomas EE, Puterman ML, Kawano E, Curran M. Evaluation of seven immunoassays for detection of rotavirus in pediatric stool samples. *J Clin Microbiol* 1988; 26(6):1189-1193.
48. Pirkooh A, Shahrabadi M. Development of a latex agglutination method for diagnosis of rotavirus infections. *Iran J Med Sci* 2007; 32(2):100-104.
49. Maes RK, Grooms DL, Wise AG et al. Evaluation of a human group a rotavirus assay for on-site detection of bovine rotavirus. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1):290-294.
50. Jensen A. Evaluation of two commercial kits for rapid detection of human rotavirus in feces: Rotalex, a latex agglutination test and Rotavirus ELISA Kit. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B* 1985; 93(2):159-160.
51. Rodrigues C, Zattar J, Rossoni A, Stroparo E, Roque D, Romagnoli L. Impact of vaccination against rotavirus in outpatients visitis and hospitalization due to gastroenteritis in a university hospital in Brazil. 6th Annual Meeting of the World Society for pediatric Infectious Diseases. Buenos Aires 2009.

**ANEXO**

## ANEXO

### PREPARO DE REAGENTES E TÉCNICAS

#### 1. PREPARO DE REAGENTES

##### 1.1 PARA EXTRAÇÃO

1.1.1 **Tampão da Amostra:** Tris/HCl 0,01M, Cloreto de Ca<sup>++</sup> 0,0015M, pH 7,2.

1.1.2 **Etanol a 70%:** 30 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura DNase/RNase free/70 mL de álcool etílico P.A. (manter a 4°C).

##### 1.1.3 Preparação da sílica

- Pesar 60g de sílica (dioxide – Sigma) dentro de uma proveta e completar para 500mL com H<sub>2</sub>O ultrapura DNase/RNase free e homogeneizar;
- Deixar sedimentar por 24h;
- Retirar 430mL do sobrenadante por aspiração;
- Ressuspender a sílica para 500mL com H<sub>2</sub>O ultrapura DNase/RNase free e homogeneizar. Deixar sedimentar por 5h;
- Retirar 440mL do sobrenadante por aspiração e adicionar 600µL de ácido clorídrico puro (HCl P.A. a suspensão deve ficar em pH 2 - não é preciso ajuste em medidor de pH);
- Agitar com uma barra magnética dentro da proveta para manter a suspensão de sílica em constante homogeneização;
- Pipetar alíquotas de 5mL em frascos ambar e autoclavar por 20 min /121°C;
- Estocar em temperatura ambiente e no escuro.

##### 1.1.4 Tampão L6

GUSCN(isotiocianato de guanidina)	120g
Tris/HCl 0,1m - pH 6.4	100mL
0,2M EDTA - <b>pH 8.0</b>	22mL
Triton X-100	2,6g

##### 1.1.5 Tampão L2

GUSCN(isotiocianato de guanidina)	120g
Tris/HCL/ 0,1M - pH 6.4	100mL
0,2M EDTA pH 8.0	22mL

## 1.2 PARA A CONFECÇÃO DO GEL

- 1.2.1 Acrilamida a 50%/Bis-Acrilamida a 1,3 %;
- 1.2.2 4X Lower-tris: Tris-base 181,7g para 1 L /H<sub>2</sub>O destilada, pH 8,8;
- 1.2.3 4X Upper-tris: Tris-base 60,6g para para 1 L /H<sub>2</sub>O destilada, pH 6,8;
- 1.2.4 Tampão de Corrida de eletroforese - 4X concentrado- 12g de Tris-base, 57,68g de glicina, para 1 L/ H<sub>2</sub>O destilada, pH 8,2;
- 1.2.5 TBE - 89mM Tris-base, 89mM Ácido bórico, 2mM EDTA (pH 8.0).

## 1.3 PARA A COLORAÇÃO DO GEL

- 1.3.1 **Solução Fixadora:** Etanol 10%/Ácido Acético 5%/H<sub>2</sub>O destilada (q.s.p. 100mL)
- 1.3.2 **Solução Corante:** 0,185g de Nitrato de Prata/ H<sub>2</sub>O destilada (q.s.p. 100mL).
- 1.3.3 **Solução Reveladora:** 0,3g de Hidróxido de Sódio/0,02g de Borohidreto/750μL de Formaldeído P.A/ H<sub>2</sub>O destilada (q.s.p. 100mL). Preparar no dia do uso.

## 1.4 PROTOCOLO DE TÉCNICAS

### 1.4.1 Preparação da suspensão da amostra (10%)

- Colocar 1mL de tampão de amostra em tubo tipo eppendorf;
- Adicionar aproximadamente 0,1g da amostra de fezes, se forem líquidas usar proporção 1:2, e homogeneizar no vortex;
- Centrifugar por 20 minutos a 4°C – 2000rpm;
- Coletar o sobrenadante para um frasco novo e desprezar o restante em hipoclorito de sódio 5%.

### 1.4.2 Extração de dsRNA (BOOM *et al.*, 1990, modificado)

- 200μl da suspensão da amostra em tubo tipo eppendorf de 1,5mL;
- Adicionar **0,8mL** do tampão **L6** – homogeneizar no vortex;
- Após +/-5 minutos e adicionar **10μL** de sílica;
- Homogeneizar e incubar por 20 minutos a TA em agitador orbital;
- Centrifugar por 30 segundos a 14000rpm/4°C;
- Descartar o sobrenadante no pote de NaOH 10M;
- Adicionar **500μL** de tampão **L2**;



- Homogeneizar e centrifugar por 30 segundos a 14000rpm/4°C;
- Descartar o sobrenadante no pote de NaOH 10M;
- Adicionar **500µL** de **ETANOL 70%** (4°C) e homogeneizar;
- Centrifugar por 30 segundos a 14000rpm/4°C e descartar o etanol;
- Adicionar **500µL** de **ACETONA P.A.** (4°C) e homogeneizar;
- Centrifugar por 30 segundos a 14000rpm/4°C e descartar a acetona;
- Incubar em banho-maria por 15 minutos a 56°C.  
**OBS.:** deixar as tampas dos tubos tipo eppendorf abertas para evaporar a acetona.
- Adicionar **50µL** água ultrapura livre de DNase/RNase e homogeneizar;
- Incubar em banho-maria por 15 minutos a 56°C;  
**OBS.:** tampas fechadas dos tubos eppendorf.
- Homogeneizar e centrifugar por 3 minutos a 14000rpm/4°C;
- Coletar +/- **40µL** do sobrenadante em tubos tipo eppendorf novos;
- Descartar o precipitado e estocar a -70°C por muito tempo ou 4°C para o mesmo dia.

### 1.4.3 Preparação do gel

#### 1.4.3.1 Gel Separador 7,5%:

Reagentes	10 mL
Água destilada	5,7 mL
Tampão 4x "Lower Tris"	2,5 mL
Acrilamida / Bis-Acrilamida	1,5 mL
*Persulfato de Amonia 2%	0,3 mL
*TEMED	µL

#### 1.4.3.2 Gel Concentrador 3,5%:

Reagentes	2mL
Água destilada	1,22mL
Tampão 4x "Upper Tris"	0,5mL
Acrilamida / Bis-Acrilamida	0,16mL
*Persulfato de Amonia 2%	0,12mL
*TEMED	3µL

\* Os catalisadores são os últimos a serem adicionados – somente no momento de formar o gel.

- Montar o recipiente (placas de vidro e espessadores) onde o gel se formará;
- Adicionar os catalisadores à mistura do gel separador (7,5%), homogeneizar suavemente, colocar dentro do recipiente de formação do gel;

- Colocar  $\pm$  0,5mL de Butanol sobre o gel separador ainda não polimerizado (o butanol nivela o gel e evita o contato da acrilamida com o ar), aguardar a polimerização;
- Depois de polimerizado, retirar o butanol mais água, virando o recipiente, secar o resto com papel de filtro;
- Adicionar os catalisadores à mistura do gel concentrador (3,5%), homogeneizar suavemente e colocar no recipiente de formação do gel, inserir o pente imediatamente, aguardar a polimerização;
- Após a polimerização completa, retirar o pente;
- Montar as placas com o gel polimerizado na cuba de eletroforese com o tampão;
- Lavar os poços de aplicação das amostras com esse tampão para retirar o excesso de acrilamida;
- Adicionar 21 $\mu$ L das amostras, inclusive padrão SA11 e 7 $\mu$ L da solução Tris/HCL 0,0625 M, pH 6,8/Ureia 5 M /2- mercaptoetanol 5%/ SDS 3%/ azul de Bromofenol 0,01% e incubar a 56°C por 15 minutos;
- Aplicar controles e amostras nos poços;
- Conectar os plugs na fonte de eletroforese e selecionar: corrente constante, ajustar para 200 V/20mA/12 W, por  $\pm$  2 horas;
- Retirar o gel entre as placas após o tempo de corrida para coloração;

#### 1.4.4 Coloração do gel

- Transferir o gel cuidadosamente para uma cuba plástica contendo 100mL de solução fixadora;
- Homogeneizar durante 30 minutos em agitador orbital a 30rpm;
- Remover a solução fixadora e lavar o gel 3 vezes com H<sub>2</sub>O destilada;
- Adicionar 100mL de solução corante;
- Homogeneizar durante 30 minutos em agitador orbital a 30rpm;
- Remover a solução corante e lavar o gel 3 vezes com H<sub>2</sub>O destilada;
- Adicionar 100 mL da solução reveladora;
- Homogeneizar em agitador orbital a 30rpm até surgir as bandas ( $\pm$  15 minutos);
- Remover a solução reveladora e adicionar 100mL de Ácido Acético a 5%;
- Homogeneizar durante 20 minutos em agitador orbital a 30rpm;
- Remover a solução e adicionar 100mL de Etanol a 10% para interromper o ácido acético;
- Transferir o gel para folhas de acetato removendo o excesso de líquido com papel toalha e fotografar o gel.