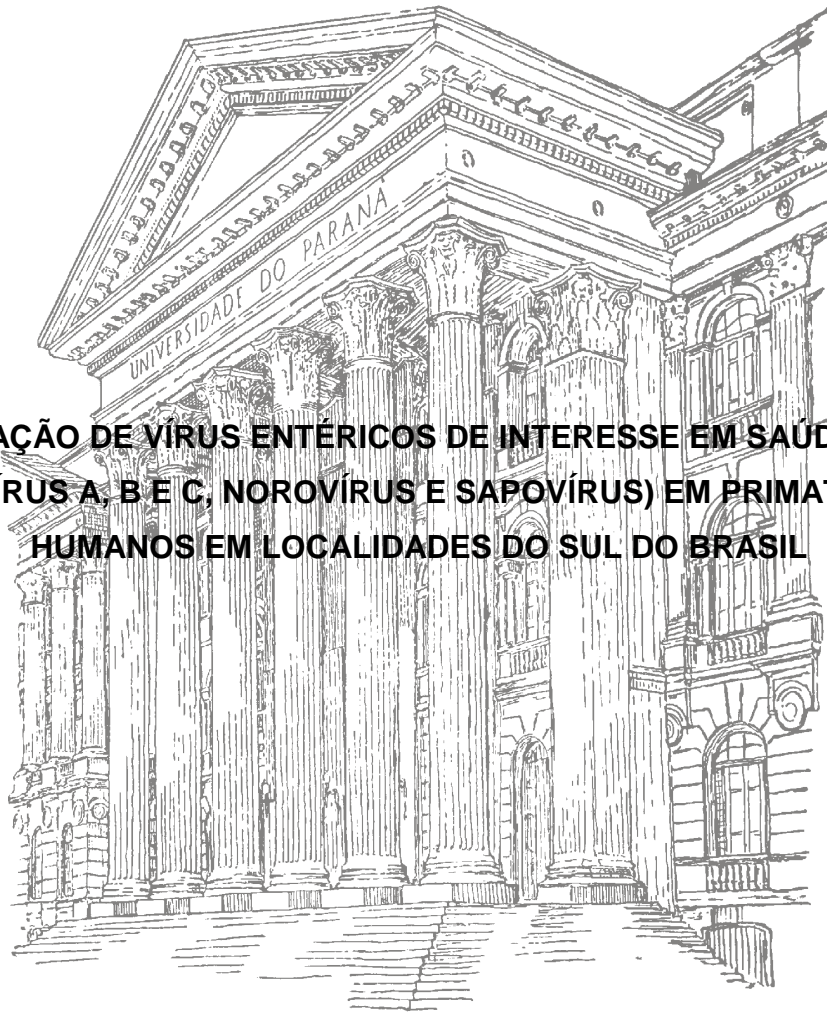


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABIANA MENONCIN SOUZA

**INVESTIGAÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA
(ROTAVÍRUS A, B E C, NOROVÍRUS E SAPOVÍRUS) EM PRIMATAS NÃO
HUMANOS EM LOCALIDADES DO SUL DO BRASIL**



CURITIBA

2011

FABIANA MENONCIN SOUZA

**INVESTIGAÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA
(ROTAVÍRUS A, B E C, NOROVÍRUS E SAPOVÍRUS) EM PRIMATAS NÃO
HUMANOS EM LOCALIDADES DO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane C.Gomes.
Co-Orientador: Prof. Dr. Walfrido K. Svoboda

CURITIBA

2011

Souza, Fabiana Menoncin
Investigação de vírus entéricos de interesse em saúde pública
(Rotavírus A, B e C, Norovírus e Sapovírus) em primatas não humanos
em localidades do sul do Brasil / – Curitiba, 2011.
132 f.: il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Eliane Carneiro Gomes
Coorientador: Professor Dr. Walfrido Kühn Svoboda
Dissertação (mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade
Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Vírus entéricos. 2. Primatas não humanos. 3. Saúde pública.
I. Gomes, Eliane Carneiro. II. Svoboda, Walfrido Kühn. III. Universidade
Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.01


TERMO DE APROVAÇÃO

FABIANA MENONCIN


Título: INVESTIGAÇÃO DE VIRUS ENTÉRICOS DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA (ROTAVÍRUS A, B E C, NOROVÍRUS E SAPOVÍRUS) EM PRIMATAS NÃO HUMANOS EM LOCALIDADES DO SUL DO BRASIL.

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.


Profª. Dra. Eliane Carneiro Gomes
Orientadora


Prof. Dr. Walfredo Kühl Svoboda
Co-orientador


Profª. Dra. Marilis Dallarmi Miguel
Universidade Federal do Paraná


Profª. Dra. Yanna Dantas Rattmann
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 20 de dezembro de 2011.

“O homem não é o único animal que pode alterar ou destruir seu ambiente, mas é o único que pode, conscientemente conservá-lo”

Fernando Dias de Ávila-Pires

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Jeová pela vida e por iluminar-me nos Seus caminhos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Eliane Carneiro Gomes, pela amizade e conselhos, assim como o incentivo e apoio recebidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao co-orientador, Prof. Dr. Walfrido Kuhl Svoboda pela amizade e pelas contribuições valiosas ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri e à Profa Dra. Alice Fernandes Alfieri responsáveis pelo Laboratório de Virologia, Universidade Estadual de Londrina por permitirem a realização deste estudo. Assim como aos estagiários, residentes, funcionários e pós graduandos, especialmente à Elis pela imensurável ajuda e simpatia.

Ao Prof. Dr. Fernando de Camargo Passos pela disponibilidade em ceder as amostras e aos pós graduandos Thiago Silvestre e Luciana pelo auxílio na obtenção das amostras.

Ao Prof. Msc. Rogério Ribas Lange por viabilizar a coleta de amostras.

Ao meu marido, Rogério, pelo amor e companheirismo demonstrado. Sem esse apoio seria impossível realizar mais essa etapa. À minha mãe Lourdes por ser uma pessoa batalhadora e me ensinou a sempre seguir em frente, também ao meu padrasto, Ivo por sempre estar ao lado da minha mãe. Ao meu pai, que mesmo não estando há muitos anos entre nós, ficaria muito feliz com mais esta minha conquista. À minha família: Paulo, Cláudia, Beatriz, Ana Claudia e Ailson pelas palavras de incentivo e momentos de descontração.

Aos colegas de trabalho do Cemepar por nos momentos finais compartilharem comigo as minhas alegrias e angústias.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná e ao corpo docente.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.

RESUMO

As gastroenterites agudas estão entre uma das causas de maior morbi-mortalidade em todo o mundo, tanto em humanos como em animais, sendo as crianças as mais afetadas. Os principais vírus causadores de gastroenterites são: rotavírus (RV), pertencentes à família Reoviridae, e os norovírus (NoV) e sapovírus (SaV), pertencentes à família Caliciviridae. Em todo o mundo, anualmente, ocorrem milhões de casos de diarreia induzidos por RV, NoV ou SaV em humanos. Além disso, há evidências de que estes vírus possam ter potencial zoonótico, ou seja, a capacidade de infectar humanos e animais. Como os seres humanos e primatas não humanos (PNH) compartilham características genéticas e fisiológicas semelhantes, vírus entéricos isolados de PNH têm recebido atenção especial, sendo amplamente utilizados tanto em pesquisas básicas quanto aplicadas. Há escassos estudos sobre RV, NoV e SaV em PNH e pesquisas relacionando a circulação destes vírus com a saúde humana. Portanto, investigar a possível distribuição de vírus entéricos entre as diferentes espécies de PNH é importante para a compreensão da incidência destes vírus e o possível rompimento das barreiras entre espécies. Desta forma, o presente trabalho visou investigar a circulação de vírus entéricos em grupos de PNH que viviam próximos de populações humanas e, ainda, contribuir com informações para o aprimoramento de medidas de prevenção e controle destas viroses de importância em Saúde Pública. Para a pesquisa de RV, NoV e SaV foram utilizadas 62 amostras de fezes de 5 espécies de PNH (saguis - *Callithrix* spp., *Callithrix penicillata*; micos-leões-da-cara-preta - *Leontopithecus caissara*; bugio-ruivo - *Alouatta guariba clamitans*; bugio - *Alouatta caraya*) que viviam em localidades próximas a populações humanas nos estados do Paraná e Santa Catarina. As amostras foram coletadas e analisadas no período de maio de 2010 a junho de 2011. As técnicas utilizadas no estudo foram: extração do RNA viral pela associação dos métodos de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e sílica/isotiocianato de guanidina; eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e *semi nested* PCR, seguido de eletroforese em gel de agarose; seqüenciamento quando necessário. Apesar da dificuldade, foram obtidas 62 amostras de fezes de PNH (43 provenientes de animais de vida livre). Porém estas amostras não apresentavam aspecto diarréico e não foi evidenciada a presença de RV (grupos A, B e C), SaV e NoV nas 5 espécies de PNH estudadas. Os resultados indicaram que não houve circulação destes vírus nos grupos de PNH no período analisado, sugerindo a necessidade de investigações contemplando maior número de PNH e outras espécies animais. Além disso, a pesquisa de vírus entéricos em grupos de PNH próximos à populações humanas pode auxiliar nos serviços de Saúde Pública na elaboração de planos e/ou programas de controle e prevenção destas viroses.

Palavras-chave: vírus entéricos. Primatas não humanos. Saúde Pública.

ABSTRACT

The acute gastroenteritis are one of the biggest causes of morbidity worldwide, both in humans and in animals. The children are most affected. The main viruses that cause gastroenteritis are rotavirus (RV), Family Reoviridae, and norovirus (NoV) and sapovirus (SaV), Family Caliciviridae. Each year, worldwide, occur million cases of diarrhea induced by RV, NoV or SaV in humans. In addition, there is evidence that these viruses have zoonotic potential, it is, the ability to infect humans and animals. As humans and nonhuman primates (NHP) have genetic characteristics and physiological similar, enteric viruses isolated from NHP have received special attention and is widely employed both in basic and applied research. There are few studies on RV, NoV and SaV in NHP and research related to circulation of these viruses to human health. Therefore, investigate the possible distribution of enteric viruses between different species of NHP is important for understanding the ecology of these viruses and can break down barriers between species. Thus, this study aimed to survey the circulation of enteric viruses in NHP groups living close to human populations, and also contribute information to improve the prevention and control of these viruses of importance in public health. The research of RV, NoV and SaV were used 62 stool samples from five species of NHP (marmosets - *Callithrix spp. Callithrix penicillata*; black-faced lion tamarins - *Leontopithecus caissara*; red howler - *Alouatta guariba clamitans*; howler - *Alouatta caraya*) living in locations close to human populations in the states of Parana and Santa Catarina, Brazil. The samples were collected and analyzed from May 2010 to June 2011. The techniques used in the study were: viral RNA extraction methods for the association of the phenol / chloroform / isoamyl alcohol and silica / guanidine isothiocyanate, polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), reverse transcription followed polymerase chain reaction (RT-PCR) and semi-nested PCR followed by agarose gel electrophoresis, sequencing when needed. Despite of the difficulty, we obtained 62 samples of feces from NHP (43 from free-living animals). But these samples did not show appearance of diarrhea and there was no evidence the presence of RV (groups A, B and C), SAV and NoV in five species studied NHP. The results indicated that there was no circulation of these viruses in NHP groups in the analyzed period, suggesting the need for more research looking at NHP and other animal species. In addition, the research of enteric viruses in NHP groups close human populations can help the public health services to prepare plans and/or control programs and prevention of these viruses.

Keywords: enteric viruses. Non Human Primates. Public Health.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DO GENOMA DO ROTAVÍRUS	21
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CAMADAS PROTÉICAS DO ROTAVÍRUS.....	24
FIGURA 3 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA REPRESENTANDO CADA UM DOS 11 SEGMENTOS DE RNA FITA DUPLA E AS RESPECTIVAS PROTEÍNAS CODIFICADAS PELO GENOMA DOS ROTAVÍRUS.....	26
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DE LIGAÇÃO, PENETRAÇÃO, TRANSCRIÇÃO E CICLO DE REPLICAÇÃO DO ROTAVÍRUS.....	28
FIGURA 5 – MICROELETROSCOPIA REPRESENTANDO VÁRIAS PARTÍCULAS DE NORWALK VÍRUS	36
FIGURA 6 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DIRETA REPRESENTANDO VÁRIAS PARTÍCULAS DE SAPPORO VIRUS	37
FIGURA 7 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO CICLO DE REPLICAÇÃO DOS CALICIVÍRUS.....	39
FIGURA 8 - NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS E PROCESSADAS, POR ESTADOS BRASILEIROS E DISTRITO FEDERAL, NA REDE DE LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO PARA ROTAVÍRUS, NO PERÍODO DE 01 DE JANEIRO A 31 DE DEZEMBRO DE 2010.....	44
FIGURA 9 - EPIDEMIOLÓGICA DAS DOENÇAS DIARRÉICAS AGUDAS, CAUSADAS POR VÍRUS EM HUMANOS, NO PARANÁ, DE JANEIRO DE 2009 A OUTUBRO DE 2011	45
FIGURA 10 - NÚMERO DE CASOS DE DIARREIA EM HUMANOS – SANTA CATARINA, 2000 A 2008	46
FIGURA 11 - ESQUEMA DA ECOLOGIA <i>CONTINUUM</i> ENTRE HOSPEDEIRO E PARASITA, AS SETAS INDICAM ALGUNS DOS FATORES DETERMINANTES PARA O SURGIMENTO DE UMA DOENÇA.....	54
FIGURA 12 - ESQUEMA REPRESENTADO A CLASSIFICAÇÃO DE ALGUNS PRIMATAS	59
FIGURA 13 - OCORRÊNCIA DE PRIMATAS NÃO HUMANOS NO MUNDO	59
FIGURA 14 - MUNICÍPIOS COM A OCORRÊNCIA DE Callitrichidae NO ESTADO	

DO PARANÁ.....	61
FIGURA 15 - MUNICÍPIOS COM A OCORRÊNCIA DE Atelidae, Alouattinae NO ESTADO DO PARANÁ.....	62
FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO DOS LOCAIS DE ESTUDO NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.....	66
FIGURA 17 - REPRESENTAÇÃO DOS LOCAIS DE ESTUDO EM SANTA CATARINA, BRASIL.....	67
FIGURA 18 –EXEMPLAR DE <i>Callithrix</i> spp., EVIDENCIADO NA REDE ELÉTRICA PARQUE BARIGUI, CURITIBA, PARANÁ	68
FIGURA 19 – EXEMPLAR DE <i>Alouatta guariba clamitans</i> NO COMPLEXO AYRTON SENNA, SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PARANÁ	69
FIGURA 20 – EXEMPLARES DE <i>Leontopithecus caissara</i> NO PARQUE DO SUPERAGUI, GUARAQUEÇABA, PARANÁ	70
FIGURA 21 – EXEMPLAR DE <i>Callithrix penicilatta</i> , PARQUE DO CÓRREGO GRANDE, FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA	72
FIGURA 22 - ESQUEMA PARA ANÁLISES DE RV GRUPOS A (P e G TIPOS), B e C.....	77
FIGURA 23 - ESQUEMA PARA ANÁLISES DE SaV E NoV	78
FIGURA 24 - ESQUEMA DA RT-PCR PARA G E P TIPO DE RV GRUPO A	83
FIGURA 25 - ESQUEMA DE RT-PCR E SEMI NESTED PCR PARA RV GRUPO B	86
FIGURA 26 - ESQUEMA DA RT-PCR PARA RV GRUPO C.....	88
FIGURA 27 - ESQUEMA DA RT-PCR PARA SaV E NoV	90
FIGURA 28 - ESQUEMA DA RT-PCR PARA SaV E NoV	91
FIGURA 29 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (EGPA) CORADO COM NITRATO DE PRATA APÓS EXTRAÇÃO POR FENOL-CLOROFÓRMIO-ÁLCOOL ISOAMÍLICO E SÍLICA-ISOTIACIANATO DE GUANIDINA EM AMOSTRAS DE FEZES DE PRIMATAS NÃO HUMANOS	95
FIGURA 30 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO OS TESTES DE RT-PCR PARA RV GRUPO A, P (876 pb) e G TIPO (1062 pb), DE AMOSTRAS DE FEZES DE PRIMATAS NÃO HUMANOS.....	96
FIGURA 31 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO	

DE ETÍDEO DEMONSTRANDO OS TESTES DE Semi-Nested PCR PARA RV GRUPO B (434 pb), DE AMOSTRAS DE FEZES DE PRIMATAS NÃO HUMANOS	97
FIGURA 32 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO OS TESTES DE RT-PCR PARA RV GRUPO C (270 pb), DE AMOSTRAS DE FEZES DE PRIMATAS NÃO HUMANOS	98
FIGURA 33 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO OS TESTES DE RT-PCR PARA NoV (181 pb) E SaV (331 pb) DE AMOSTRAS DE FEZES DE PRIMATAS NÃO HUMANOS	100
FIGURA 34 – EXEMPLAR DE ESPÉCIE INVASORA (<i>Callithrix penicillata</i>) PRÓXIMO A SERES HUMANOS, PARQUE DO CÓRREGO GRANDE, FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA.....	104
FIGURA 35 – EXEMPLAR DE ESPÉCIE INVASORA (<i>Callithrix penicillata</i>) RECEBENDO ALIMENTO DE SERES HUMANOS, PARQUE DO CÓRREGO GRANDE, FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA.....	105

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - SEGMENTO GENÔMICO, LOCALIZAÇÃO E FUNÇÕES DAS RESPECTIVAS PROTEÍNAS DO ROTAVÍRUS-.....	23
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – EXEMPLOS DE ESPÉCIES DE PRIMATAS NÃO HUMANOS EM QUE FORAM INVESTIGADOS A PRESENÇA DE ROTAVÍRUS.....	60
TABELA 2 - RELAÇÃO DAS AMOSTRAS, LOCAL DE OBTENÇÃO E ESPÉCIES DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS.....	73
TABELA 3 - RELAÇÃO DAS AMOSTRAS E RESULTADOS OBTIDOS PELOS MÉTODOS EGPA, RT-PCR PARA RV-A E <i>SEMI NESTED</i> PCR PARA RV-B E RV-C, DE 2010 A 2011, LONDRINA-PR, 2010-2011.....	94
TABELA 4 - RELAÇÃO DAS AMOSTRAS E RESULTADOS OBTIDOS PELO MÉTODO RT-PCR PARA NoV E SaV, DE 2010 A 2011, LONDRINA-PR, 2010-2011	99

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	-	Agência Nacional da Vigilância Sanitária
CaCl ₂	-	Cloreto de cálcio
CDC	-	<i>Centers for Disease Controls and Prevention</i>
CEPESBI	-	Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial
DLPs	-	<i>double-layered particle</i>
DNA	-	Ácido desoxiribonucléico
EDTA	-	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGPA	-	Eletroforese em gel de poliacrilamida
EIE	-	Ensaio imunoenzimático
FURB	-	Fundação Universidade Regional de Blumenau
Ha	-	Hectares
IR	-	Intermediário de replicação
IUCN	-	International Union for Conservation of Nature
kDa	-	Kilo Dalton
M	-	Molar
mA	-	Mili amperes
Mabs	-	Anticorpos monoclonais
mM	-	miliMolar
NSP	-	Non-structural protein
NoV	-	Norovírus
OIE	-	World Organization for Animal Health
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
ORF	-	Open Read Frame
p/v	-	Peso/volume
pb	-	Pares de bases
PCR	-	Reação em cadeia da polimerase
PNH	-	Primatas não humanos
RNA	-	ribonucleic acid
RNAfd	-	RNA fita dupla
RNAfs	-	RNA fita simples

RNA _m	-	Rna Mensageiro
RT-PCR	-	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
RV	-	Rotavírus
SDS	-	Dodecil sulfato de sódio
SaV	-	Sapovírus
TLP	-	Triple-layered particle
UV	-	Ultra violeta
VORH	-	Vacina oral de rotavírus em humano
VP	-	Viral protein
WHO	-	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVO GERAL	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 GASTROENTERITES VIRAIS DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA.....	18
2.2 PRINCIPAIS VÍRUS ENTÉRICOS DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA	19
2.2.1 Rotavírus.....	19
2.2.1.1 Características dos RV	20
2.2.1.2 Padrão eletroforético dos RV.....	25
2.2.1.3 Replicação e morfogênese dos RV	26
2.2.1.4 Patogenia e modo de transmissão dos RV.....	30
2.2.1.5 Diagnóstico laboratorial para rotaviroses.....	31
2.2.1.6 Classificação dos RV.....	33
2.2.1.7 Tratamento contra os RV.....	35
2.2.2 Norovírus e sapovírus.....	35
2.2.2.1 Características gerais dos NoV e SaV.....	37
2.2.2.2 Replicação dos NoV e SaV	38
2.2.2.3 Patogenia e modo de transmissão dos NoV e SaV	39
2.2.2.4 Diagnóstico Laboratorial dos NoV e SaV.....	41
2.2.2.5 Modelo de doença em animal e hospedeiros dos NoV e SaV	42
2.2.2.6 Características clínicas e tratamento das gastroenterites por NoV e SaV....	42
2.3 A IMPORTÂNCIA DOS RV, NoV E SAV PARA A SAÚDE PÚBLICA	43
2.3.1 Epidemiologia dos RV, NoV e SaV: morbidade, mortalidade e principais genótipos envolvidos nas gastroenterites	46
2.3.2 Considerações sobre prevenção contra infecções por RV, NoV e SaV	50
2.4 AS DOENÇAS INFECCIOSAS EMERGENTES, AS ZONÓSES E OS ANIMAIS SILVESTRES.....	52
2.4.1 Aspectos zoonóticos dos RV	55
2.4.2 Aspectos zoonóticos dos Nov e SaV	57
2.5 PRIMATAS NÃO HUMANOS NO MUNDO E NO BRASIL.....	58
2.6 A IMPORTÂNCIA DOS PRIMATAS NÃO HUMANOS EM SAÚDE PÚBLICA	62

2.6.1	Aplicabilidade da vigilância de epizootias em PNH na Saúde Pública	64
3	MATERIAL E MÉTODOS	66
3.1	LOCAIS DE ESTUDO	66
3.1.1	Fragmento florestal Parque Barigui, Curitiba, Paraná	67
3.1.2	Fragmento florestal Complexo Ayrton Senna, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil.....	68
3.1.3	Parque Nacional do Superagui, Guaraqueçaba, Paraná.....	69
3.1.4	Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial (CEPESBI), Indaial, Santa Catarina.....	70
3.1.5	Parque Ecológico Córrego Grande, Florianópolis, Santa Catarina.....	71
3.2	AMOSTRAS.....	73
3.2.1	Descrição das coletas das amostras	74
3.3	INVESTIGAÇÃO DE RV, SAV E NoV EM FEZES NAS ESPÉCIES DE PNH (CALLITHRIX SPP., CALLITHRIX PENICILLATA, LEONTOPITHECUS CAISSARA, ALOUATTA GUARIBA CLAMITANS E ALOUATTA CARAYA)	75
3.3.1	Extração do RNA viral em amostras de fezes	78
3.3.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) para análise de RV- A, RV-B e RV-C.....	80
3.3.3	Diagnóstico do RV grupo A (P e G tipos).....	81
3.3.4	Diagnóstico do RV grupo B.....	84
3.3.5	Diagnóstico do RV grupo C	86
3.3.6	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para pesquisa de NoV e SaV	88
3.4	ANÁLISE DO PRODUTO DA PCR.....	92
3.5	SEQUENCIAMENTO	92
4	RESULTADOS	93
4.1	PESQUISA DE RV GRUPOS A, B E C	93
4.1.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA).....	94
4.1.2	RT-PCR para RV grupo A: P e G tipos	96
4.1.3	Semi nested PCR para RV grupo B.....	97
4.1.4	RT- PCR para RV grupo C	98
4.2	RT-PCR PARA NoV E SAV	99
5	DISCUSSÃO.....	101
6	CONCLUSÃO	108

REFERÊNCIAS.....	109
GLOSSÁRIO.....	127
APÊNDICES	128

1 INTRODUÇÃO

As gastroenterites agudas são causadas por vírus, bactérias e protozoários e estão entre uma das causas de maior morbidade em todo o mundo, tanto em humanos como em animais, sendo que as crianças são as principais afetadas. Dentre estes vírus podemos destacar os seguintes: rotavírus (RV), pertencentes à família *Reoviridae*, e os vírus da família *Caliciviridae*, os norovírus (NoV) e sapovírus (SaV). Em todo o mundo, anualmente, ocorrem cerca de 138 milhões de casos de diarreia induzidos por RV e, acredita-se que aproximadamente 611.000 crianças morrem por ano devido à infecção por RV (PARASHAR *et al.*, 2006). Além disso, estima-se que o NoV, a cada ano, possa causar cerca de 1,1 milhões de hospitalizações e 218.000 mortes de crianças nos países em desenvolvimento (PATEL *et al.*, 2008). O impacto das sapovirose não foi totalmente estabelecido, mas há descrições de surtos de SaV associados à gastroenterites em lactentes e crianças jovens (GREEN, 2007).

As doenças infecciosas emergentes são moléstias transmissíveis causadas por bactérias ou vírus nunca antes descritos ou por novas formas infectantes geradas a partir de mutações em um microrganismo já conhecido. É possível ainda que sejam causadas por um agente que já parasitava animais e depois começou a infectar também o homem. A população humana em expansão tem impulsionado o surgimento de doenças infecciosas emergentes através do aumento da densidade populacional, especialmente em áreas urbanas (dengue, cólera), e usurpação do *habitat* dos animais selvagens (DASZAK, CUNNINGHAM, HYATT; 2000). A maioria das doenças infecciosas emergentes são zoonoses (doenças naturalmente transmitidas de animais vertebrados para humanos, e vice-versa) e muitas procedem de animais de vida livre. As zoonoses representam um problema de Saúde Pública mundial, pois contribuem para encargos significativos para a economia global e a saúde pública e, causam grande impacto em fatores sócio-econômicos, ambientais e ecológicos. A tendência é que o número dessas doenças aumente significativamente ao longo do tempo (JONES *et al.*, 2008). Assim, os animais desempenham um papel essencial na manutenção das infecções zoonóticas na natureza. As zoonoses podem ser bacterianas, virais ou parasitárias, ou podem envolver agentes não convencionais, por exemplo príons (KAHN, 2006). RV, NoV e SaV possuem potencial zoonótico, bem como características de doenças infecciosas emergentes.

O potencial zoonótico do RV é evidenciado por meio do monitoramento da circulação do RV na população humana, fornecendo evidências de que os animais podem atuar como fonte de multiplicação do vírus e/ou de material genético para a diversificação do RV humano (ALFIERI *et al.*, 1996; SANTOS; HOSHINO, 2005; GENTSCH *et al.*, 2005). Milhares de pessoas estão expostas todos os anos aos RV animais, seja em comunidades agrícolas ou pessoas que esporadicamente encontram-se nestes locais, ou pelo homem constantemente adentrar ambientes onde existem animais silvestres. Este contato com locais altamente contaminados por dejetos animais pode resultar em algumas infecções permitindo a entrada contínua de estirpes de RV na população humana de origem animal (COOK *et al.*, 2004). A partir de técnicas de genotipagem em amostras de RV provenientes de estudos epidemiológicos, se demonstra a ocorrência da transmissão interespecie. Isto pode ser constatado por meio de estudos investigativos em humanos apresentando infecção por estirpes virais de origem animal (primatas não humanos - PNH, cães, gatos, porcos e bovinos) (OTSYULA *et al.*, 1996; DAS *et al.*, 1993; GOUVEA *et al.*, 1993; VONSOVER *et al.*, 1993). A melhora na adaptação ao novo hospedeiro, juntamente com a falta de imunidade específica preexistente na população contra a nova estirpe, poderia explicar a rápida propagação das novas estirpes e de sua persistência nas populações humanas.

O potencial zoonótico do NoV e SaV é discutido, devido à grande semelhança entre calicivírus isolados de humanos e animais. Estudos relacionados à presença de anticorpos contra o NoV animal foram detectados em seres humanos, bem como anticorpos NoV humanos em suínos, bovinos e PNH (BANK-WOLF *et al.*, 2010; SCIPIONI *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2004).

Assim como em humanos, a doença diarréica é uma das principais causas de morbidade em macacos, inclusive está associada com alta mortalidade em algumas colônias de PNH, sendo os principais agentes os RV e os NoV (WANG *et al.*, 2007). Como os seres humanos e PNH compartilham características genéticas e fisiológicas semelhantes, RV, isolados de PNH têm recebido atenção especial, sendo amplamente utilizados tanto em pesquisa básica quanto aplicada (HOSHINO *et al.*, 2006).

Salienta-se que apesar de existir vacina contra o RV humano licenciada no Brasil, Rotarix®, esta é indicada para a prevenção de gastroenterites por RV causadas pelas estirpes G1 e não-G1 (G2, G3, G4 e G9) (BRASIL, 2005b). Sendo

assim, há uma preocupação se a introdução de vacinas contra o RV para crianças pode alterar o perfil epidemiológico da doença. A vigilância epidemiológica contínua é fundamental para a compreensão dos efeitos de curto e longo prazo das vacinas contra RV, na ecologia viral (envolve o conhecimento dos hospedeiros naturais e a inferência dos ciclos prováveis de transmissão) e implantação de futuras estratégias vacinais (MARTELLA *et al.*, 2010).

Portanto, investigar a possível presença de vírus entéricos entre as diferentes espécies de PNH é importante para a compreensão da ecologia dos vírus entéricos, dos mecanismos de evolução dos mesmos e o possível rompimento das barreiras entre espécies. Desta forma, o presente trabalho visa investigar a circulação dos vírus entéricos em grupos de PNH que vivam próximos de populações humanas. Ainda, pretende-se contribuir com informações que visem o aprimoramento de medidas de prevenção e controle destas gastroenterites virais de importância em Saúde Pública.

1.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de vírus entéricos (rotavírus grupos A, B e C; norovírus e sapovírus) em amostras de fezes de primatas não humanos (*Callithrix* spp., *C. penicillata*, *Leontopithecus caissara*, *Alouatta guariba clamitans* e *A. caraya*) que vivem próximos a populações humanas em algumas localidades dos estados do Paraná e de Santa Catarina, visando contribuir como um indicador para as ações em Saúde Pública.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar metodologias diagnósticas estabelecidas, validadas e viáveis para investigar a presença de rotavírus grupos A, B e C; norovírus e sapovírus em fezes de primatas não humanos.
- Avaliar a circulação de estirpes de vírus entéricos humanos em primatas

não humanos.

- Fornecer subsídios aos serviços de Saúde Pública, visando contribuir com a prevenção e o controle das gastroenterites virais aqui estudadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GASTROENTERITES VIRAIS DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA

Gastroenterite é a inflamação do estômago e do intestino. A gastroenterite viral é uma infecção causada por uma variedade de vírus que resulta em vômitos ou diarreia. As gastroenterites virais são causadas pelos seguintes agentes: rotavírus (RV), norovírus (NoV), sapovírus (SaV), adenovírus e astrovírus. As gastroenterites não-virais são causadas por bactérias (como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*) ou parasitas (tais como *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium*), ou por medicamentos, ou outras condições médicas.

A pessoa acometida pode ter dor de cabeça, febre e cólicas abdominais. Em geral, os sintomas começam um a dois dias após a infecção e pode durar de um a dez dias, dependendo do vírus causador da doença (*Centers for Diseases Control and Prevention* - CDC, 2011). As complicações ocorrem devido à desidratação e ao desequilíbrio eletrolítico, podendo causar óbito, principalmente, se a diarreia estiver associada com a desnutrição e doenças crônicas (SANTOS; SOARES, 2008).

As diarreias infecciosas, incluindo as gastroenterites virais, constituem-se uma das principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo, tanto em humanos e animais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a doença diarreica seja responsável por 18% dos 10,6 milhões de mortes anuais de crianças abaixo de cinco anos de idade. Nos Estados Unidos, estima-se que ocorram 211 a 375 episódios de diarreia aguda anualmente, gerando custos anuais estimados em até 23 de bilhões de dólares em despesas médicas e perda de produtividade (SANTOS; SOARES, 2008).

Em 1994, no Brasil foi implantado o programa de “Monitorização de Doenças Diarreicas Agudas”, um método de vigilância sentinela, ágil e de avaliação contínua. Em 2004, foram notificados 2.395.485 casos de diarreia distribuídos nas cinco regiões do Brasil, sendo a região Nordeste apresentando os maiores índices. No período de 1996 a 2003 foram destinados R\$ 173.245.567,85 ao pagamento de despesas hospitalares. Ainda no Brasil, em 2006, ocorreram 2.236 óbitos por diarreia entre crianças menores de cinco anos, provavelmente 40% destes podem

estar associadas aos RV (BRASIL, 2006; SANTOS; SOARES, 2008).

2.2 PRINCIPAIS VÍRUS ENTÉRICOS DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA

Dentre os principais vírus causadores de gastroenterites destacam-se os RV, SaV e NoV. O RV é um dos agentes causadores mais comuns de gastroenterites agudas em crianças, causando cerca de 2 milhões de hospitalizações ao ano em crianças menores de cinco anos (WHO, 2004). Em todo o mundo, anualmente, ocorrem cerca de 138 milhões de casos de diarreia induzidos por RV e acredita-se que, aproximadamente, 611.000 crianças morrem por ano devido à infecção por RV e destas, mais de 80% são de países subdesenvolvidos (PARASHAR *et al.*, 2006). Além disso, estima-se que o NoV, a cada ano, possa causar cerca de 1,1 milhões de hospitalizações e 218.000 mortes de crianças nos países em desenvolvimento (PATEL *et al.*, 2008). O impacto das sapovirose não foi totalmente estabelecido, mas há descrições de surtos de SaV associados à gastroenterite em lactentes e crianças jovens (GREEN, 2007).

2.2.1 Rotavírus

Os RV humanos foram descritos pela primeira vez por Bishop *et al.* (1973) na Austrália, por meio do estudo da mucosa duodenal de crianças com gastroenterite não bacteriana e identificaram partículas virais por Microscopia Eletrônica. No ano seguinte, foram observados vírus com características semelhantes ao estudo anterior em amostras fecais de crianças com gastroenterite aguda não bacteriana (BISHOP *et al.*, 1974).

A primeira descrição da presença de RV em animais foi nas décadas de 1960 e 1970 por detectar as partículas do tipo RV no intestino de animais apresentando doenças diarreicas (ESTES; KAPIKIAN, 2007). Woode *et al.*, em 1975, relataram RV em fezes de suínos com diarreia. Desde então, inúmeros trabalhos têm sido publicados relacionando os RV a gastroenterites em diversas espécies de mamíferos e de aves.

2.2.1.1 Características dos RV

O RV pertence à família Reoviridae, seu nome vem do latim: *rota* significa roda, devido à aparência da estrutura da cápside externa com aspecto de roda de carroça quando observado por Microscopia Eletrônica (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001).

O RV possui as seguintes características:

- a) partículas virais maduras possuem aproximadamente 75 nm de diâmetro, formato icosaédrico e não envelopados,
- b) seu genoma viral é composto por 11 segmentos de RNA dupla-fita (RNAfd);
- c) possui seis proteínas virais estruturais, VP (Viral Protein), denominadas: VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7; e possui seis proteínas não-estruturais, denominadas NSP (Non-Structural Protein), variando entre NSP1 a NSP6
- d) apresentam capsídeo composto por três camadas de proteínas: uma camada externa, uma camada intermediária, e o *core*, ou camada interna;
- e) as partículas virais contêm um RNA-polimerase dependente de RNA e outras enzimas necessárias à síntese de RNA mensageiro (RNAm);
- f) a replicação do vírus ocorre no citoplasma das células infectadas;
- g) os vírus são capazes de realizar rearranjo genético;
- h) *in vitro* o cultivo do vírus é facilitado pelo tratamento com enzimas proteolíticas, que aumentam a capacidade por infecção pela clivagem da proteína VP4, um polipeptídeo localizado no capsídeo externo;
- i) as partículas virais são formadas por brotação no retículo endoplasmático e são evidentes transitoriamente nesta etapa da morfogênese;
- j) as partículas maduras são liberadas a partir da lise (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

- Genoma dos RV

O genoma do RV é constituído por 11 segmentos de RNA fita dupla (RNAfd), e estão localizados no *core*. O tamanho dos segmentos varia de 667 pb (pares de base a 3302 pb de tamanho, totalizando 6.120 kDa, ou 18.555 pb (PRASAD; ESTES, 2000). Quando o RV é desproteínezado os segmentos genômicos não são contagiosos, refletindo o fato de que as partículas virais contêm sua própria RNA polimerase-dependente de RNA para transcrever cada um dos segmentos de RNA em RNAm (RNA mensageiro) ativo (ESTES, 2001).

Cada segmento de RNA começa com uma guanidina na terminação 5', seguido por um conjunto de seqüências conservadas que fazem parte da região 5'-não codificadora. Após, segue uma região aberta de leitura (ORF, *Open Reading Frame*), que codifica uma proteína. Na extremidade 3', o códon de terminação é seguido por um conjunto de seqüências não-codificadoras. Estas seqüências são altamente conservadas e terminam com duas citidinas. Quase todos os RNAm possuem no fim a seqüência consenso 5'-UGUGACC-3', e essas seqüências contêm sinais importantes para a expressão dos genes e replicação do genoma. Os comprimentos das regiões 3' e 5'-não codificadoras variam de acordo com diferentes genes, e nenhum sinal de poliadenilação é encontrado na extremidade 3' dos genes (FIGURA 1). Todos os genes seqüenciados possuem pelo menos uma ORF longa depois do primeiro códon de iniciação (ESTES, 2001). A grande conservação das seqüências terminais nos segmentos genômicos sugere que elas contêm importantes sinais para a transcrição, transporte de RNA, replicação, montagem ou empacotamento dos segmentos genômicos (PATTON; SPENCER, 2000).

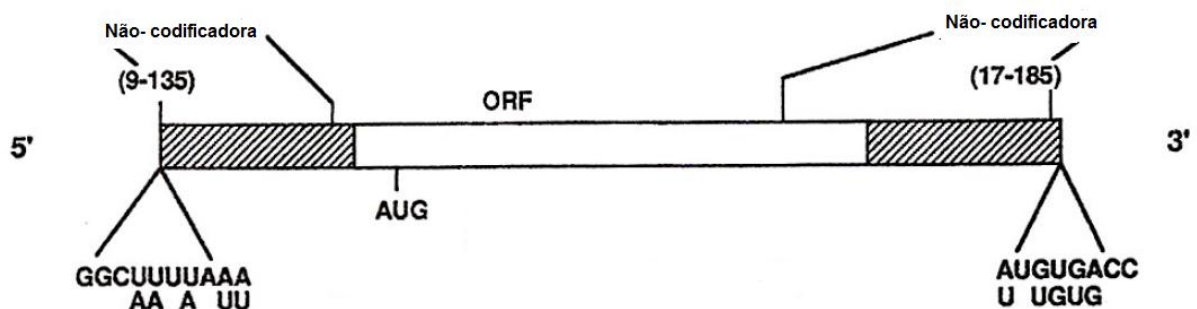


FIGURA 1 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DO GENOMA DO ROTAVÍRUS
 FONTE: Adaptado de ESTES (2001)

- Proteínas dos RV

Os segmentos do genoma do RV codificam proteínas estruturais encontradas em partículas virais e as proteínas não-estruturais encontradas nas células infectadas, mas não nas partículas virais maduras. Seis segmentos do genoma codificam proteínas estruturais e outras seis são proteínas não-estruturais (DESSELBERGER, 2000).

As proteínas virais estruturais, VP, estão nomeadas por ordem decrescente da massa molecular. No *core* estão presentes as proteínas VP1 (125KDa), VP2 (94KDa) e VP3 (88KDa); na camada intermediária a VP6 (46KDa), e na camada externa as proteínas VP4 (88KDa) e VP7 (38KDa). As proteínas não-estruturais, NSP, variam entre NSP1-NSP5, algumas estirpes de RV podem não ter a proteína não-estrutural, NSP6 (ESTES, 2001).

Há seis proteínas não estruturais codificadas pelo genoma viral, NSP1 a NSP6:

- a) NSP1 é a maior destas proteínas e possui o domínio *zinc finger*, este domínio é encontrado em proteínas que se ligam a ácidos nucleicos. Ela está envolvida nos estágios iniciais da montagem das partículas virais.
- b) NSP2 está relacionada ao mecanismo de replicação viral e tem a capacidade de se ligar ao RNA fita simples (RNAfs).
- c) NSP3 determina a interrupção da tradução na célula infectada.
- d) NSP4 auxilia na maturação da partícula viral no retículo endoplasmático e funciona como uma enterotoxina (ESTES; KAPIKIAN, 2007; DÉCTOR *et al.*, 2002).
- e) NSP5 e NSP6 são codificadas em duas ORF diferentes mas no mesmo segmento genômico, e estão envolvidas na formação do viroplasma, que são inclusões citoplasmáticas que surgem 2 a 3 horas após a infecção (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

No (QUADRO 1) os segmentos genômicos e as proteínas virais com suas respectivas funções e localização na partícula viral estão relacionados.

SEGMENTO GENÔMICO	PRODUTO PROTEÍNA	LOCALIZAÇÃO	FUNÇÃO
1	VP1	Core	RNA-polimerase dependente de RNA
2	VP2	Core	Liga-se ao RNA viral
3	VP3	Core	Guaniltransferase
4	VP4 (VP5 e VP8)	Capsídeo externo	Hemaglutinina, proteína de ligação à célula, peptídeo de fusão, antígeno de neutralização
5	NSP1	Não estrutural	Ligação ao RNA viral
6	VP6	Capsídeo interno	Antígeno de subgrupo, necessário para transcrição
7	NSP3	Não estrutural	Inibe a tradução de proteínas celulares, ligação ao terminal 3' do RNAm viral
8	NSP2	Não estrutural	Ligação ao RNA, helicase, forma viroplasmas com NSP5
9	VP7	Capsídeo externo	Glicoproteína antígeno neutralizante
10	NSP4	Não- estrutural	Glicoproteína, papel na morfogênese, modulada íons Ca ²⁺ intracelular, enterotoxina
11	NSP5	Não- estrutural	Ligação ao RNA, forma viroplasma com NSP2, interage com VP2 e NSP6
	NSP6	Não- estrutural	Interage com NSP5, presente no viroplasma

QUADRO1 - SEGMENTO GENÔMICO, LOCALIZAÇÃO E FUNÇÕES DAS RESPECTIVAS PROTEÍNAS DO ROTAVÍRUS

FUNÇÃO: SANTOS e SOARES (2008).

NOTAS: NSP –non structural protein; VP – viral protein

- Estrutura protéica dos RV

As três camadas protéicas estão representadas na (FIGURA 2) e com a seguinte estrutura (PRASAD; ESTES, 2000):

a) *Core*, ou camada central

Contém o genoma viral e, é formado por VP2 e as proteínas VP1 (RNA polimerase-dependente de RNA) e VP3 (uma guaniltransferase e metilase).

b) Capsídeo interno (camada intermediária)

Composto de 260 trímeros de VP6, que são interrompidos por 132 canais aquosos de três tipos diferentes em relação à simetria do capsídeos.

c) Capsídeo externo (camada externa)

Composto de 260 trímeros de VP7 e 60 dímeros de VP4. As proteínas VP4 e VP7 interagem com VP6.

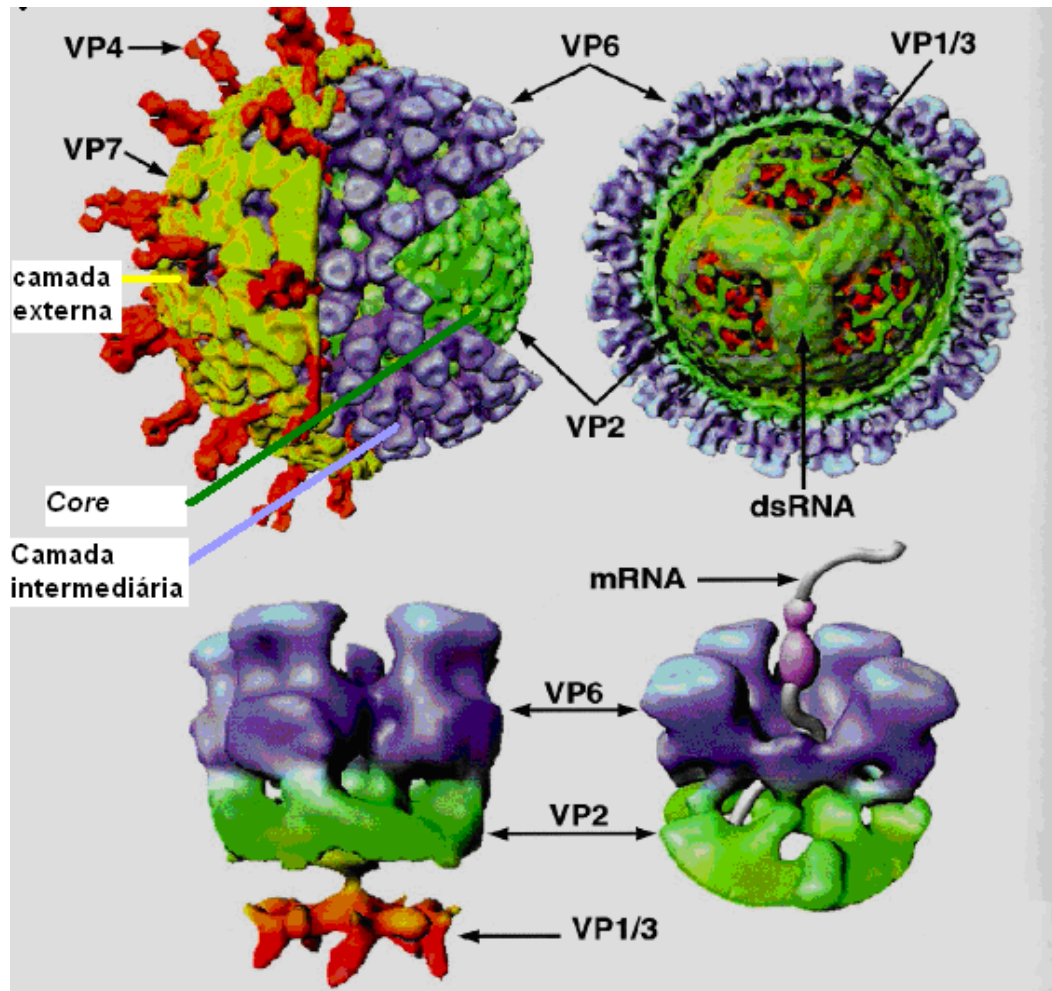


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CAMADAS PROTÉICAS DO ROTAVÍRUS
 FONTE: VANREGENMORTEL *et al.* (2000)

As proteínas do *core* viral (VP1, VP2, VP3) tem afinidade pelo RNAfs (RNA fita simples), VP1 (Pol) e VP3 (Cap) estão diretamente associadas ao genoma. A proteína VP2 constitui a capa, sendo a mais abundante do *core* viral com 120 moléculas por *vírião*. Cada uma das proteínas desempenha um papel central nos processos de transcrição e replicação do RNA: a proteína VP1 possui atividade de RNA polimerase RNA - dependente e a proteína VP3 tem atividade de guaniltransferase, estando envolvidas na adição da estrutura 5'-cap presente no RNAm (VALENZUELA *et al.*, 1991). Embora VP1 e VP2 são ambas necessárias para a atividade replicase, o papel essencial da VP2 na replicação está ligada à sua

capacidade de ligar-se ao RNAm (PATTON *et al.*, 1997).

O capsídeo intermediário é formado por 780 moléculas da proteína estrutural VP6, dispostos em 260 unidades triméricas e posicionados em todos os eixos da malha icosaédrica (FIGURA 2). Esta disposição oferece maior integridade estrutural ao capsídeo viral (MATHIEU *et al.*, 2001).

O capsídeo externo é composto por duas proteínas, VP4 e VP7, que são responsáveis pelas interações iniciais do vírus com a célula hospedeira. A superfície externa do vírus é levemente ondulada devido à presença de 780 cópias da glicoproteína VP7, em arranjos triméricos. Estruturas semelhantes às espículas são formadas por 120 cópias da proteína VP4 divididas em 60 estruturas diméricas assimétricas (YEAGER *et al.*, 1994). A proteína VP4 interage com a VP6 e VP7 permitindo a manutenção da estrutura geométrica e afeta os domínios funcionais. Além disso, VP4 contém um sítio de clivagem pela tripsina e quando submetida ao tratamento com protease *in vitro* produz dois produtos, as proteínas VP5 e VP8, aumentando a infectividade do vírus (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

2.2.1.2 Padrão eletroforético dos RV

Os RV são os únicos agentes infecciosos conhecidos de mamíferos e aves que apresentam 11 segmentos de RNAfd (ESTES, 2001). O RNA genômico pode ser extraído de partículas virais semi-purificadas e separado de acordo com as massas moleculares e a velocidade de migração, utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), apresentando um padrão eletroforético, ou eletroferotipo, típico para esses vírus (PEREIRA *et al.*, 1983).

Na maioria dos casos, o padrão eletroforético do genoma do vírus do grupo A é composto por quatro segmentos de RNAfd de alto peso molecular (1-4), dois segmentos de porte médio (5 e 6), um trio de segmentos distintos (7 a 9) e dois segmentos menores (10 e 11) (FIGURA 3). A análise de eletroferotipos é uma técnica relativamente fácil, rápida e popular para a detecção do vírus e para estudos de epidemiologia molecular para monitorar epidemias de vírus e sua transmissão. No entanto, padrões distintos de RNA podem surgir por diferentes mecanismos (substituição, rearranjos), esses perfis não podem ser usados como único critério

para a classificação de uma estirpe viral (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

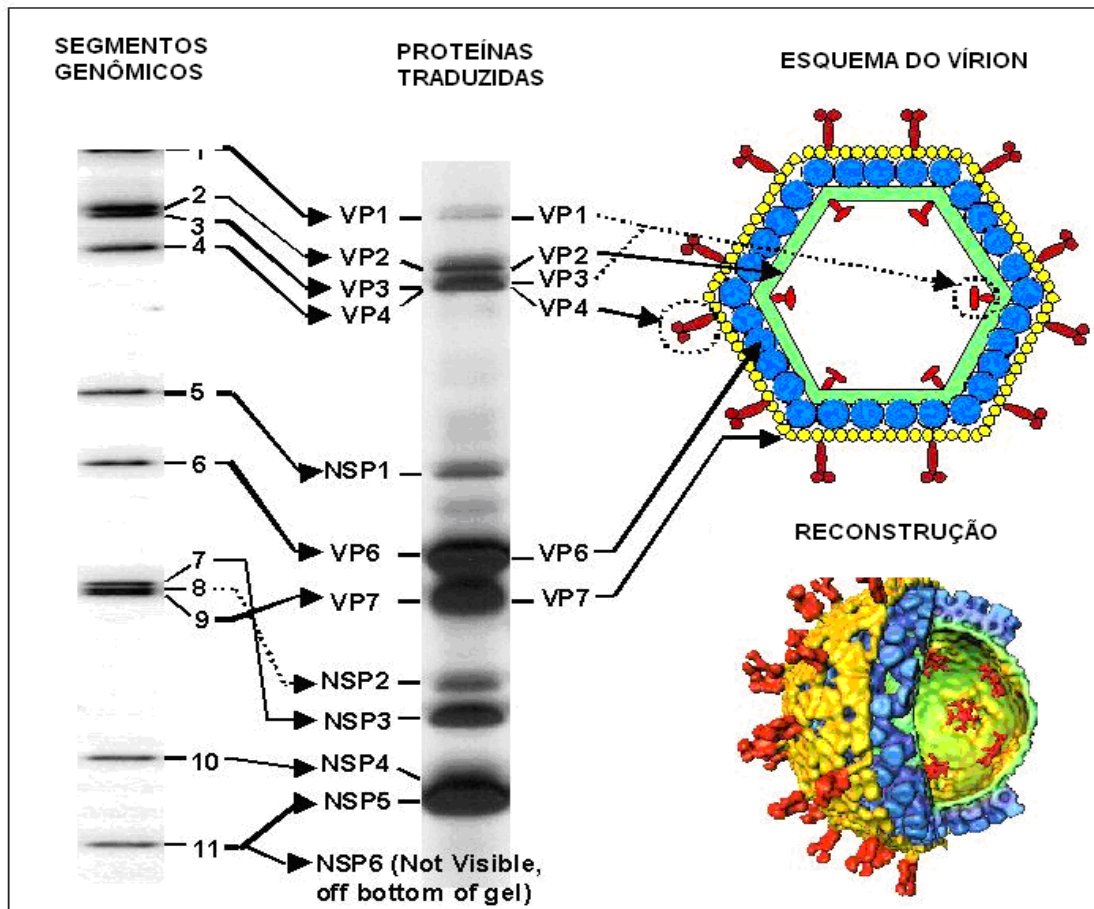


FIGURA 3 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA REPRESENTANDO CADA UM DOS 11 SEGMENTOS DE RNA FITA DUPLA E AS RESPECTIVAS PROTEÍNAS CODIFICADAS PELO GENOMA DOS ROTAVÍRUS

FONTES: MERTENS; ATTOUI; BAMFORD (2010)

2.2.1.3 Replicação e morfogênese dos RV

- Replicação dos RV

Os detalhes de adsorção, entrada e revestimento do RV são complexos e ainda permanecem parcialmente incompreendidos. As proteínas VP4 e VP7 estão implicadas nas interações iniciais com células hospedeiras. O passo inicial na infecção pelo vírus consiste na ligação deste à superfície das células hospedeiras. Os RV possuem maior afinidade pelos enterócitos, são células maduras e não proliferativas que recobrem as vilosidades intestinais. Porém, é possível que o RV infecte uma variedade de células, sugerindo que a ligação inicial (adsorção) é uma

interação inespecífica (CIARLET; ESTES, 1998). Entende-se que a ligação inicial é uma interação com os receptores de membrana e esta etapa é crítica para a entrada do vírus na célula. A entrada do RV na célula é um processo coordenado, com várias etapas que envolvem interações com diversos ligantes e uma série de mudanças conformacionais nas proteínas do capsídeo. A fixação do vírus na célula ocorre devido à interação da proteína VP4 ou seus produtos de clivagem VP5 e VP8, obtido através do tratamento com tripsina (ZARATE *et al.*, 2000), na partícula contendo três envoltórios protéicos TLP (*triple-layered particle*) (CRAWFORD *et al.*, 1994). A ação da tripsina sobre VP4 aumenta a penetração viral e infectividade, porém esse mecanismo ainda não está totalmente elucidado (ESTES; GRAHAM; MASON, 1981; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Acredita-se que as estirpes de RV diferem em sua capacidade de infectividade por mecanismos que podem envolver o ácido siálico e mecanismos que possuem diferentes sensibilidades frente à neuraminidase (ISA; ARIAS; LOPEZ, 2006). Para algumas estirpes do vírus, a interação inicial de VP8 com ácido siálico contendo receptores celulares geram mudanças conformacionais na proteína VP4 do vírus que permitem a interação com uma integrina (proteína da membrana celular) através de uma seqüência em VP5 (GRAHAM *et al.*, 2003). Nos RV resistentes à neuraminidases, a proteína VP4 já pode estar em uma conformação que lhe permite interagir diretamente com os receptores.

A internalização, ou seja, a penetração do vírus na célula, não ocorre de 0°C a 4°C, indicando que esta etapa requer processos celulares ativos. Os vírus são internalizados em 60 a 90 minutos após a ligação. Há dois possíveis mecanismos de internalização: endocitose mediada por receptor (RUIZ *et al.*, 1994) e penetração direta na membrana (KALJOT *et al.*, 1988). Acredita-se que a endocitose mediada por receptor utiliza um mecanismo dependente da diminuição da concentração de íons Ca^{2+} (RUIZ; COHEN; MICHELANGELI, 2000). O outro mecanismo possível, a entrada direta, no qual a tripsina foi detectada associada ao capsídeo exterior do RV e é ativada pela solubilização das proteínas do capsídeo externo, propõe-se que a tripsina ativa a clivagem de VP7 e VP4 em fragmentos capazes de perturbar as membranas e isso pode permitir que as partículas virais com dupla camada, *Double-layered particles* (DLP) tenham acesso ao citoplasma para iniciar a transcrição do RNAm viral ativamente para completar o próximo passo no ciclo de vida do vírus (GOLANTSOVA; GORBUNOVA; MACKOW, 2004).

A síntese dos transcritos virais é mediada por uma RNA polimerase viral dependente de RNA (transcriptase). A transcriptase é um componente do *vírion*, faz parte do complexo VP1 e VP3 e, aparece como um elemento em forma de flor e está ligado à superfície da camada interna em todos os vértices do icosaedro (ESTES; KAPIKIAN, 2007). As partículas de RV contêm as enzimas necessárias para a síntese do RNAm, incluindo a transcriptase, fosfohidrolase nucleotídeo, guanililtransferase e metilases (IMAI *et al.*, 1983). A transcrição é assimétrica, ou seja, a transcrição tem lugar apenas num filamento de RNA e todos os transcritos são fitas positivas feitas a partir da fita negativa de RNAfd. A transcrição primária pode ocorrer antes da formação do viroplasma, que são inclusões citoplasmáticas contendo proteínas virais (SILVESTRI; TARAPOREWALA; PATTON, 2004). O ciclo de ligação, penetração, transcrição, tradução estão representados na FIGURA 4.

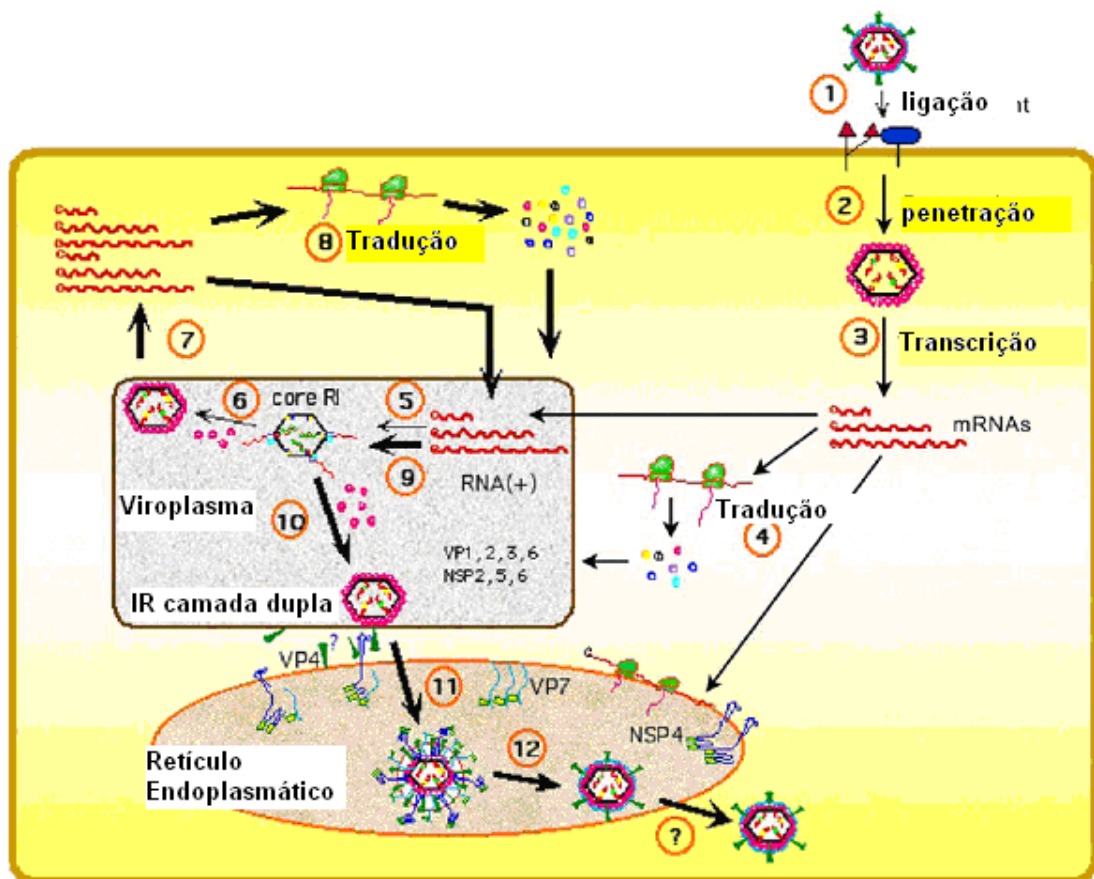


FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DE LIGAÇÃO, PENETRAÇÃO, TRANSCRIÇÃO E CICLO DE REPLICAÇÃO DO ROTAVÍRUS

LEGENDA: As diferentes fases são indicadas por números: (1) ligação: interação do *vírion* com a superfície da célula; (2) penetração e a remoção das proteínas do envelope da partícula viral para produção de DLPs; (3) transcrição primária do RNAfd genômico; (4) síntese das proteínas virais; (5) montagem do intermediário de replicação (IR) e síntese de RNA fita negativa; (6) montagem do IR em duas camadas; (7) transcrição secundária do IR camada dupla; (8) tradução: síntese secundária, com reforço de proteínas virais; (9) montagem aumentada, secundária de *core* do IR e síntese de RNA fita

negativa; (10) aumento secundário do IR em camada dupla; (11) liberação do IR camada dupla através da membrana do retículo endoplasmático e aquisição do envelope de membrana; (12) perda do envelope de membrana e produção de *vírions* maduros com três camadas.

FONTE: ARIAS *et al.* (2004)

- Morfogênese dos RV

Uma característica distinta da morfogênese do RV é que as partículas subvirais, que se reúnem no viroplasma citoplasmático, brotam através da membrana do retículo endoplasmático, e as partículas são transitoriamente envolvidas por um envelope, este é perdido e é substituído por uma fina camada de proteínas que em última análise, constitui o capsídeo externo de *vírions* maduros, ou seja, as partículas virais completas. A maioria das proteínas virais são sintetizadas nos viroplasmas, e a formação dos novos *vírions* envolve uma participação dinâmica das proteínas virais do citoplasma e dos viroplasmas. É altamente coordenada a formação do *core* com uma cópia de cada um dos 11 segmentos do genoma dos RV (PATTON; SPENCER, 2000). Uma vez que as partículas com duplo capsídeo estão formadas, elas passam dos viroplasmas para o interior do retículo endoplasmático adjacente. Durante a replicação viral a proteína não estrutural NSP4 está inserida na membrana do retículo endoplasmático, na qual apresenta a função de receptor para partículas incompletas que apresentam duas camadas protéicas e que são denominadas DLPs e interage com a proteína VP6. Durante sua translocação para o lúmen do retículo, essas partículas imaturas adquirem o capsídeo externo formado pelas proteínas VP4 e VP7, formando a partícula completa, também chamada de TLPs, ou *vírion*. Ao final deste processo, a partícula viral apresenta um envelope composto pela membrana do retículo endoplasmático, o qual é posteriormente removido pela NSP4 (PORUCHYNSKY; ATKINSON, 1991). Ao final do ciclo de replicação a progênie é liberada por lise das células hospedeiras (ALTENBURG; GRAHAM; ESTES, 1980).

A dupla infecção de células com duas estirpes diferentes de RV leva a replicação simultânea dos genes e síntese de proteínas de ambos os vírus, e, em fase de montagem, a formação de rearranjos dos segmentos em combinações diferentes dos genes, podem ocorrer, incluindo também o surgimento de diferentes genótipos/sorótipos G/P (DESSELBERGER, 2000).

2.2.1.4 Patogenia e modo de transmissão dos RV

O RV replica-se em enterócitos, sugerindo que estas células diferenciadas expressam fatores necessários para a infecção e replicação eficiente do vírus. A gravidade e a localização da infecção intestinal variam entre as espécies animais, no entanto, as alterações patológicas são essencialmente limitadas ao intestino delgado. Em diferentes modelos animais, a infecção por RV é associada com poucas lesões visíveis, como vacuolização dos enterócitos ou alterações histopatológicas significativas. A inflamação é leve em comparação com o observado com outros patógenos intestinais. Em muitos casos, não existe uma correlação clara entre o grau de alterações histopatológicas e a gravidade da doença diarréica, essa dicotomia é explicada pela existência de uma variedade de mecanismos de patogênese. Fatores virais e do hospedeiro interferem na patogenicidade da doença (ESTES; KAPIKIAN, 2007). Diversas proteínas virais envolvidas na virulência foram identificadas: VP3, VP4, NSP1, VP6, VP7, NSP2, NSP3 e NSP4. (RAMIG, 2004). Outras proteínas têm papéis no que segue: (1) na eficiência da replicação do vírus (VP3, NSP2, VP6, NSP3); (2) no desligamento da síntese de proteína do hospedeiro (NSP3); (3) na propagação extra-intestinal do vírus (NSP3 e VP6); (4) na entrada do vírus nas células (VP4 e VP7); (5) na regulação na indução de interferon (NSP1); (6) e na indução de diarreia (NSP4). A diarreia por RV tem sido atribuída a diferentes mecanismos, incluindo má absorção secundária devido a: destruição dos enterócitos, isquemia das vilosidades, toxina viral NSP4, e ativação do sistema nervoso entérico (LUNDGREN; SVENSSON, 2001).

A descoberta de NSP4 como enterotoxina viral mostra que essa proteína tem propriedades pleiotrópicas, ou seja, além de seu papel na replicação viral e morfogênese intracelular, ela possui a atividade como fator de virulência (HOSHINO *et al.*, 1995). A glicoproteína não estrutural, NSP4, do RV provoca um aumento do cálcio intracelular em células de inseto e quando purificada produz diarreia induzida em ratos jovens (6-10 dias), mostrando que a doença produzida por NSP4 é idade-dependente, dose-dependente e específica. A NSP4 potencializa a secreção de cloreto em uma via de sinalização dependente de cálcio e a glicoproteína age como uma enterotoxina viral, desencadeando uma via de transdução de sinal e

mobilização do Ca^{2+} intracelular (BALL *et al.*, 1996). Acredita-se que a proteína NSP4 é liberada pelas células infectadas pelo RV e tem efeitos parácrinos em células adjacentes não infectadas (ESTES; KAPIKIAN, *et al.*, 2007). Por outro lado foi demonstrada a capacidade de atenuar a diarreia por RV em camundongos e em crianças usando drogas que bloqueiam a via do sistema nervoso entérico (LUNDGREN *et al.*, 2000), e NSP4 ou outros mediadores liberados pelas células infectadas por vírus que podem mediar esses efeitos diretos ou estimulando respostas de células enterocromafins (argentafins) (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A infecção pelo RV causa diarreia grave e vômito, principalmente em lactentes e crianças pequenas, porém pode levar a desidratação grave e morte. O modo de transmissão é oral-fecal através de alimentos e água contaminados com o vírus, mas alguns autores relatam a transmissão pelas vias respiratórias (COOK *et al.*, 1990). O período de incubação é de 48 horas. O tempo de liberação do vírus pelo agente contaminado dura em média 10 dias, mas pode chegar até 57 dias (RICHARDSON *et al.*, 1998).

As partículas virais mantêm sua integridade e infecciosidade quando expostas ao fluorocarbono, éter, clorofórmio. A partícula é estável entre pH 3 e 9. A resistência à inativação física (juntamente com o grande número de partículas virais eliminadas nas fezes) pode contribuir para a eficiente transmissão do RV humano. O RV humano e animal são estáveis à temperatura ambiente, podem durar vários meses. O vírus tem a capacidade de sobreviver em diversas superfícies e em diferentes condições contribuindo para a rápida disseminação desses agentes. O etanol 95% é talvez o melhor desinfetante, pois remove o capsídeo externo do vírus, porém a desinfecção dos materiais contaminados e cuidadosa lavagem das mãos constituem medidas importantes para conter a infecção por RV, especialmente em um hospital ou estrutura institucional. Além dos seres humanos, acredita-se que os animais também são reservatórios para a transmissão do RV (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

2.2.1.5 Diagnóstico laboratorial para rotavirose

O vírus é identificado por pesquisa de antígenos nas fezes pelo método de

aglutinação em látex, técnicas sorológicas como EIE, e técnicas mais acuradas para identificação do sorotipo/genotipo por EGPA, RT-PCR, hibridização e seqüenciamento (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

As manifestações clínicas da doença por RV não são suficientemente distintas para permitir o diagnóstico apenas nos sintomas. O diagnóstico, portanto, requer a detecção do vírus ou antígeno viral, a demonstração de uma resposta sorológica, ou ambos (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Muitos ensaios têm sido desenvolvidos para a detecção de RV nas fezes, como a visualização direta do material de fezes por Microscopia Eletrônica para detecção de rotavírus. Esta técnica tem a vantagem de alta especificidade, porque o RV tem uma aparência morfológica distintiva. A Microscopia Eletrônica continua a ser importante no diagnóstico de doenças causadas por RV e é frequentemente utilizado para resolver as discrepâncias nos resultados de outras técnicas. A vantagem da Microscopia Eletrônica é o de ser um método mais rápido para o diagnóstico, porém não distingue entre sorotipos e genótipos e requer equipamento e pessoal altamente especializado (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

O método automático de confirmação de escolha em muitos laboratórios é o EIE, pois é sensível e possui controle nas reações inespecíficas. Ainda são usados rotineiramente outros métodos de detecção viral, tais como imunofluorescência, aglutinação em látex e EIE com anticorpos mono ou policlonais (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A detecção do genoma viral pode ser realizada EGPA, RT-PCR ou hibridização. A hibridização é um método altamente específico, gerando resultados que são concordantes com aqueles obtidos com outros testes, como a microscopia eletrônica e EIE. A técnica mais importante é a RT-PCR, que é 5.000 vezes mais sensível que a hibridização (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

O genoma segmentado, característico do RV, permite a aplicação da técnica EGPA para a identificação desses vírus, é uma das técnicas mais utilizadas para a detecção dos segmentos dos ácidos nucléicos. Apesar de eficiente esta técnica não permite a classificação em sorotipos. A técnica de EGPA é utilizada para vírus RNA de genoma segmentado, porém é uma técnica barata e fácil de ser realizada. A EGPA consiste na separação, através do tamanho molecular dos segmentos genômicos virais em gel de poliacrilamida. A distância de migração de cada segmento de RNA viral na eletroforese é inversamente proporcional ao peso

molecular do mesmo. Estes segmentos podem ser visualizados por coloração com Nitrato de Prata. Este teste permite a análise de variações no genoma viral além de permitir a detecção da ocorrência de infecções mistas (ALFIERI *et al.*, 2007; HERRING *et al.*, 1982)

2.2.1.6 Classificação dos RV

Até 1980, acreditava-se que todos os RV tinham antígenos comuns detectados através de imunoensaio e havia um número limitado de vírus espécie-específicos, ou seja, cada estirpe infecta somente espécies de animais específicas (WOODE *et al.*, 1976). Estudos recentes têm demonstrado que nenhuma dessas hipóteses iniciais é verdadeira (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Atualmente se sabe que os RV são classificados sorologicamente por um método que permite a presença de vários grupos e a existência de múltiplos sorotipos dentro de cada grupo. Um grupo de RV inclui vírus que compartilham antígenos de reação cruzada, ou seja, estirpes de RV diferentes possuem antígenos em comum, detectáveis por uma série de testes sorológicos, como a imunofluorescência, ensaio imunoenzimático (EIE) e imunomicroscopia. Também foi demonstrado que amostras de origem animal e humana podem ocorrer dentro do mesmo grupo (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

- Grupos e Subgrupos dos RV

A classificação em grupo é determinada pela proteína VP6, codificada pelo segmento genômico 6, localizada no capsídeo intermediário do vírus e é a proteína mais abundante, através de testes sorológicos como EIE (ESTES, 2001). Os RV são classificados em sete grupos distintos (A a G). Os grupos A, B, C são aqueles principalmente encontrados em seres humanos e animais, enquanto que os vírus nos grupos D, E, F e G foram confirmados apenas em animais até agora. Os vírus dentro de cada grupo são capazes de rearranjo genético, mas não ocorre rearranjo entre vírus de diferentes grupos (WARD *et al.*, 1990). Os RV do grupo A são os principais causadores de doença diarreica em jovens, já os do grupo B, estão

associados com epidemias anuais de diarreia grave em adultos principalmente na China (NAKATA, *et al.*, 1987; BARMAN, *et al.*, 2006). Os vírus do grupo C esporadicamente têm sido relatados em amostras de fezes de crianças e o seu significado clínico permanece obscuro (ESTES, 2001).

Os RV do grupo A são ainda classificados em subgrupos pela especificidade da proteína VP6. A classificação em subgrupo é determinada através de EIE utilizando-se anticorpos monoclonais (MAbs). São descritos os seguintes subgrupos: I, II, I+II, e não I/II (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001).

Dentro de cada grupo, os RV são classificados em sorotipos definidos pela reatividade deles em testes de redução de neutralização em placas com soro hiperimune de animais previamente expostos (MIDTHUN *et al.*, 1989; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

- Sorotipos e Genotipos dos RV

A designação para sorotipo é denominada pela expressão de epítomos (determinadas regiões na proteína viral ao qual o anticorpo se liga) de neutralização em ambas as proteínas ou seus segmentos genômicos, VP4 e VP7. Há um sistema duplo de classificação, semelhante à nomenclatura estabelecida para o vírus Influenza (distinguindo diferentes Hemaglutinina e neuraminidases). Os genotipos de VP4 (derivado da proteína protease-sensível e denominado tipo P) e VP7 (derivado da glicoproteína e denominado tipo G) são determinados por seqüenciamento ou análise de hibridização, enquanto os sorotipos são determinados por testes sorológicos. Todos os tipos G e P podem ser claramente distinguidos pela seqüência dos genes relevantes (genotipos). Todos os genotipos G foram caracterizados como sorotipos, porém, este não é o caso de todos genotipos P. Portanto, a seguinte nomenclatura foi definida: cada vírus tem um tipo P, indicado por um número de ordem para o sorotipo e por um número de ordem para o genotipo; já um sorotipo G, indicado por um número de ordem (coincidindo com o número de genotipo). Assim, a estirpe humana Wa é definida como P1A[8]G1 (sorotipo-P 1A, genotipo-P 8; sorotipo/genotipo-G 1). Devido as proteínas VP4 e VP7 serem codificadas por diferentes segmentos de RNA (RNA 4, e RNA 7-9, respectivamente), várias combinações entre G e P podem ser observadas *in vivo* e *in vitro*, tanto no homem quanto em animais (PRASAD; ESTES, 2000). Atualmente há pelo menos 23

diferentes genótipos de VP7, denominados tipos G (URSU *et al.*, 2009). E há pelo menos 31 diferentes genótipos de VP4, denominados tipos P (ABES *et al.*, 2009; SOLBERG *et al.*, 2009; SCHUMANN *et al.*, 2009).

- Genogrupos dos RV

Estudos de hibridização de RNA-RNA permitem ainda, o estabelecimento da classificação do RV do grupo A em genogrupos. O termo genogrupo indica um grupo de vírus que pode ser classificado num mesmo grupo genético, com base na homologia dos seus segmentos genômicos. Como exemplo pode citar *Wa-like* e *DS1-like*, estas amostras são exclusivamente humanas (SANTOS; SOARES, 2008).

2.2.1.7 Tratamento contra os RV

O objetivo primário do tratamento de gastroenterite causada por RVI é repor os líquidos e eletrólitos perdidos pelo vômito e diarreia. Administração de fluidos por via intravenosa tem sido utilizada com sucesso por muitos anos no tratamento da desidratação por diarreia. Várias formulações de soluções sais de reidratação oral têm se mostrado eficazes no tratamento da desidratação causada pela diarreia por rotavírus, com algumas pequenas variações na sua eficácia. O uso de antimicrobianos não é recomendado e também o uso de antidiarréicos. Deve-se manter a dieta habitual. Geralmente evolui para a cura espontânea (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

2.2.2 Norovírus e sapovírus

A família *Caliciviridae* é composta de vírus pequenos (27-40 nm), sem envelope, icosaédrico e o genoma são constituídos de RNA linear, fita simples e polaridade positiva, com 7,3-8,5 kb (kilobases) de comprimento. Há quatro gêneros nesta família: *Norovirus* (NoV), *Sapovirus* (SaV), *Vesivirus* e *Lagovirus*. Os NoV e o

SaV são os de maior importância médica, causam gastroenterite aguda, principalmente em humanos, mas, já foram detectados em animais. Os vesivírus e lagovírus infectam principalmente animais e incluem o calicivírus felino, que causa uma doença respiratória em gatos, e os lagovírus tais como o vírus da doença hemorrágica em coelho, que é muitas vezes fatal (GREEN, 2007).

Em 1972, foi descoberto o vírus Norwalk por Kapikian e colaboradores em Norwalk, Ohio, através da técnica de Imuno-eletro microscopia (KAPIKIAN *et al.*, 1972). Apesar de tentativas não foi possível à propagação deste vírus através do cultivo celular ou cultura de órgãos. O NoV foi inicialmente denominado a estirpe protótipo para um grande grupo denominado "Norwalk-like vírus" ou "*small round structured viruses*" (GREEN, 2007) (FIGURA 5).

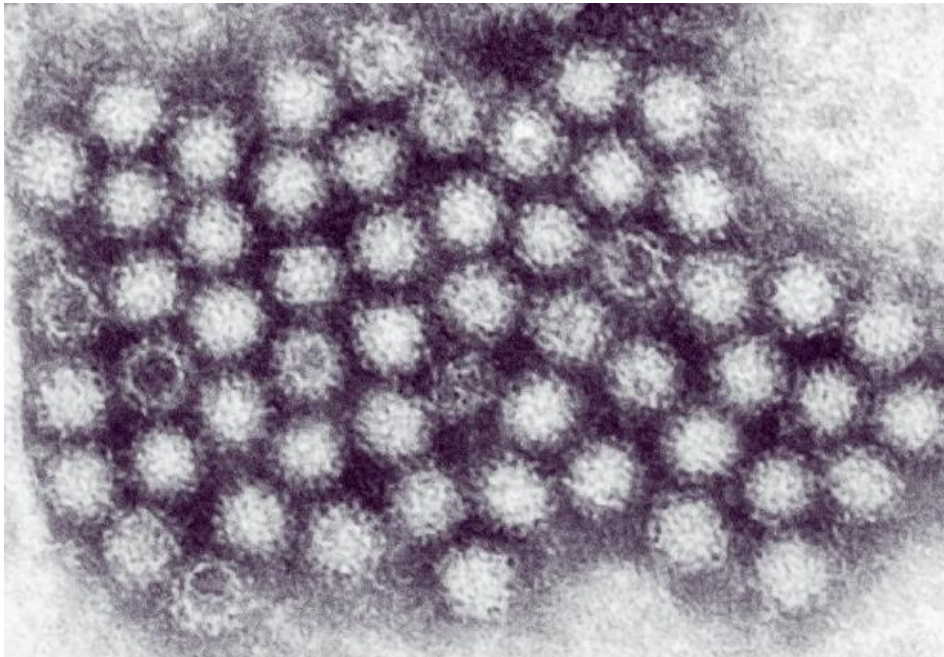


FIGURA 5 – MICROELETROSCOPIA REPRESENTANDO VÁRIAS PARTÍCULAS DE NORWALK VÍRUS
FONTE: GREEN (2007)

Em 1977, na cidade de Sapporo, Japão foi descrito um surto de gastroenterite em lactentes e crianças num orfanato causado pelo vírus Sapporo e se tornaria o protótipo da estirpe "Sapporo-like vírus" e "calicivírus clássicos" (GREEN, 2007) (FIGURA 6).

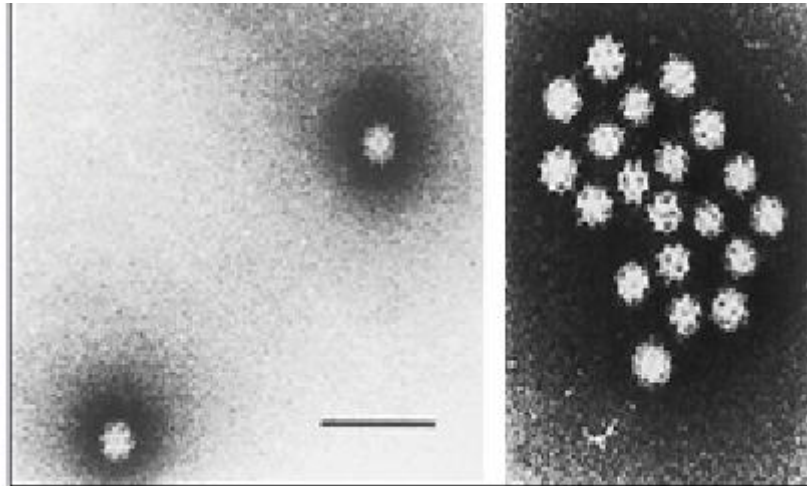


FIGURA 6 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DIRETA REPRESENTANDO VÁRIAS PARTÍCULAS DE SAPPORO VIRUS

FONTE: GREEN (2007)

2.2.2.1 Características gerais dos NoV e SaV

Os NoV mantêm a infectividade nas seguintes situações: em pH 2.7 por 3 horas a temperatura ambiente; em tratamento com éter a 4°C por 18 horas; incubação a 60°C por 30 minutos; em tratamento com 3,75 a 6,25 mg/L de cloro. Todavia, é inativado com tratamento de cloro a 10 mg/L (GREEN, 2007). A Portaria n. 518, de 25 de março de 2004, estabelece os padrões de qualidade para a água de consumo humano, nesta norma o teor máximo de cloro residual livre permitido na água é de 0,5 mg/mL (BRASIL, 2004).

Os *vírions* apresentam simetria icosaédrica, formato arredondado e capsídeo sem envelope. Possui na superfície estrutura em forma de taça e por isso, o nome calicivírus (*calici* é derivado da palavra latina cálice, ou copo) (GREEN, 2007).

O genoma viral está organizado em duas ou mais ORFs dependendo do gênero. Próximo da terminação 5' são codificadas as proteínas não-estruturais na ORF1, e as proteínas estruturais (VP1 e VP2) são codificadas em direção a terminação 3'. Os NoV codificam a proteína VP1 estrutural numa ORF2, enquanto SaV codifica a VP1 contígua como uma grande poliproteína não estrutural na ORF1. Todos os calicivírus codificam uma ORF relativamente pequena perto da terminação 3' que codifica as proteínas estruturais menores, VP2. A proteína VP2 é variável em tamanho entre os calicivírus (12.000 a 29.000 Da) e também é divergente na

seqüência entre os vírus dentro de certos grupos (GREEN, 2007).

- Proteínas dos NoV e SaV

São três proteínas encontradas no *vírions* calicivírus maduros: VP1, VP2 e VPg. A VP1 (~60.000 Da) é a maior proteína estrutural do vírus e está presente em 180 cópias (90 dímeros) por *vírion*. Devido à predominância da proteína VP1 no capsídeo viral, ela desempenha um papel crítico na determinação do fenótipo antigênico e interações do vírus com a célula hospedeira. A VP2 (12.000 a 20.000 Da) é considerada a menor proteína estrutural e está presente somente uma a duas cópias por *vírion* e sua função ainda não é esclarecida. A VPg está covalentemente ligado ao RNA genômico e subgenômico em células infectadas (GREEN, 2007).

A ORF1 é traduzida em uma poliproteína grande, esta por sua vez é autoclivada em seis proteínas não-estruturais por uma protease viral denominada proteinase cisteína. Os produtos de clivagem são os seguintes:

- a) uma proteína N-terminal (p48);
- b) um nucleosídeo 2C-*like* trifosfatase (NTPase);
- c) uma proteína de 20 kDa 3A-*like* (p20);
- d) a proteína VPg (16 kDa);
- e) uma proteína 3C-*like* proteinase cisteína;
- f) um proteína 3D-*like* RNA polimerase dependente de RNA (DONALDSON *et al*, 2008).

2.2.2.2 Replicação dos NoV e SaV

Primeiro, o *vírion* deve interagir com a célula hospedeira (provavelmente através de um receptor específico de vírus), e então a entrada, desncapsulamento, tradução dos RNAm, replicação do RNA, maturação e por fim, liberação estão representados na FIGURA 7.

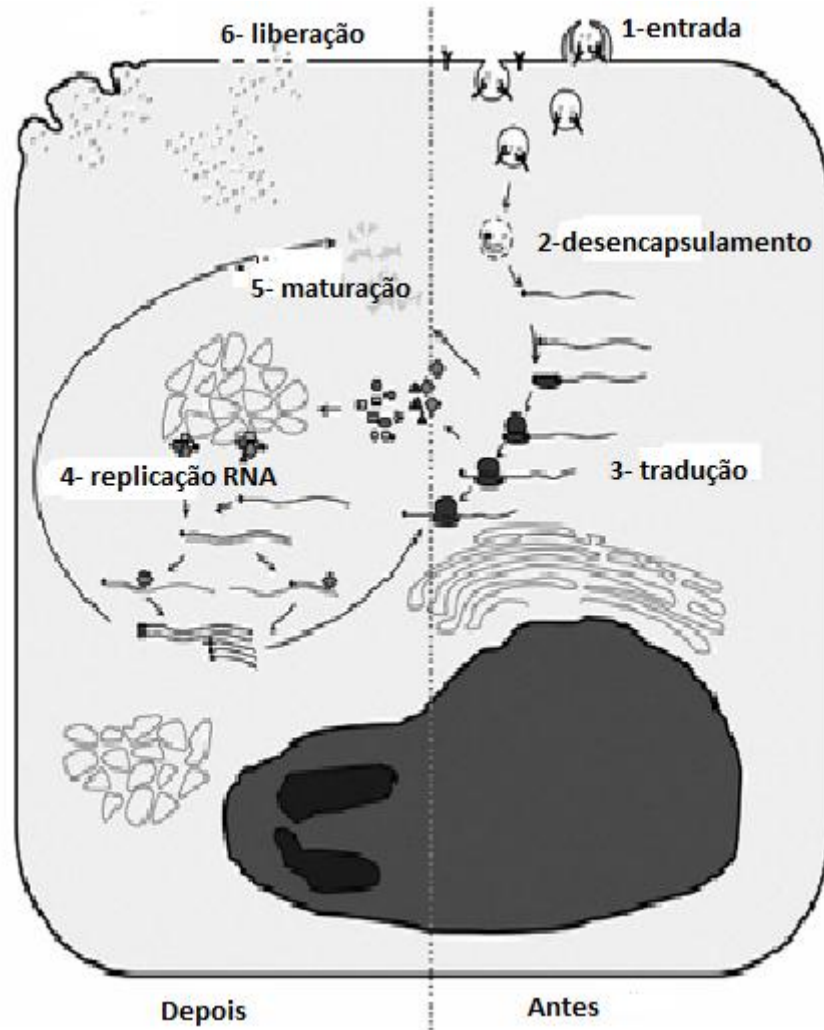


FIGURA 7 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO CICLO DE REPLICAÇÃO DOS CALICIVÍRUS

LEGENDA: (1) entrada da partícula presumivelmente ocorre, e, posteriormente, o (2) RNA viral é liberado no citoplasma (desencapsulamento). Os carboidratos têm sido apontados como componentes de receptores dos calicivírus. (3) O início da tradução do genoma é provavelmente mediada por interações da proteína VPg e a maquinaria de tradução celular. A ORF1 é traduzida para produzir a poliproteína não estrutural, que é transformado em precursores e produtos da protease viral. O início da síntese da fita RNA *antisense* (negativo), a partir do RNA molde (genômico), ocorre a partir da terminação 3' do RNA positivo e pode envolver interações com as proteínas celulares. O RNA negativo, por sua vez, serve como modelo para as transcrições de duas grandes fitas RNA positivas. (4) Como outros vírus RNA fita positiva, a replicação do RNA viral está associada com as membranas das células do hospedeiro. (5, 6) O empacotamento do RNA viral, maturação e liberação das partículas virais são pouco compreendidas (GREEN, 2007)

FONTE: GREEN (2007)

2.2.2.3 Patogenia e modo de transmissão dos NoV e SaV

Presume-se que o local de replicação primário dos calicivírus seja no trato intestinal. E ainda, tem sido proposto que a função motora gástrica anormal é

responsável pelas náuseas e vômitos associados a esses agentes virais, mas o mecanismo responsável pela doença não são conhecidas. Os calicivírus humanos são liberados a partir do trato intestinal do hospedeiro nas fezes. Porém, os NoV foram detectados também em vômito. Técnicas mais sensíveis (por exemplo, RT-PCR) têm mostrado que a liberação do NoV após a infecção pode ocorrer antes do início e após o fim dos sintomas, e pode persistir por vários dias ou semanas (7-13 dias). Estudos da história natural de NoV em uma comunidade descobriram que 26% dos 99 pacientes examinados eliminavam o vírus (detectados por RT-PCR) até três semanas após o início da doença. Esta observação sugere que os indivíduos infectados se recuperando da doença por NoV podem continuar a eliminar o vírus após o período sintomático. Os SaV têm sido associados com infecção assintomática em crianças que freqüentam creches (GREEN, 2007; ROCKX, *et al.*, 2002).

Pouco se sabe sobre a base molecular da virulência dos NoV, embora as estirpes variem em patogenicidade entre os membros da Família *Caliciviridae*.

Os NoV foram associados com infecção prolongada em pacientes imunocomprometidos e, portanto, a transmissão nosocomial de NoV e SaV para tais pacientes deve ser evitada através de medidas cautelares. Num estudo com um paciente em terapia imunossupressora devido a um transplante de coração eliminou uma estirpe de NoV GII por mais de dois anos (NILSSON *et al.*, 2003).

O modo de transmissão dos calicivírus humanos é por via oral fecal e através de aerossóis gerados durante jatos de vômito, porém a transmissão pela via respiratória não foi estabelecida. *Vírions* são estáveis em ambiente ácido, coerente com a capacidade de sobreviver à passagem pelo estômago. Estudos epidemiológicos sugerem que os vírus podem estar também em aerossóis, como os gerados a partir do vômito explosivo que ocorre muitas vezes durante a doença (MARKS *et al.*, 2003). O período de incubação é curto, variando de 10 a 51 horas, com uma média de 24 horas. Sendo que a doença aguda geralmente dura cerca de 24 a 48 horas (GREEN, 2007).

A natureza explosiva de alguns surtos por NoV, em que um grande número de pessoas adoecem dentro de 24 a 48 horas, indica que a infecção é geralmente adquirida a partir de uma fonte comum. O veículo de transmissão está intimamente relacionado à ingestão de água e alimentos contaminados (principalmente crustáceos). A infecção pela água pode ser atribuída à: sistemas de abastecimento

de água; água armazenada em navio de cruzeiro e água recreativa. Os surtos de origem alimentar foram associados com a ingestão de ostras ou saladas. A transmissão de calicivírus humanos pela ingestão de alimentos contaminados e a veiculação pela água tem sido motivo de preocupação sobre a segurança pública em agências regulatórias (GREEN, 2007; SCHAUB; OSHIRO, 2000).

2.2.2.4 Diagnóstico Laboratorial dos NoV e SaV

A RT-PCR, atualmente, é a técnica mais utilizada para a detecção de NoV. Com este método, os NoV podem ser detectados em amostras clínicas (fezes ou vômito) e em alimentos contaminados, água ou fômites. A aplicação da RT-PCR ganhou ampla utilização, pois permite a detecção rápida, assim como a comparação dos níveis de RNA viral. A RT-PCR, juntamente com a análise da seqüência dos produtos desta reação, tem sido amplamente utilizado para detectar e caracterizar vários surtos de NoV. (VINJÉ *et al.*, 2003; VAN MAARSEVEEN *et al.*, 2010; BUTOT *et al.* 2010; ATMAR; ESTES, 2001).

Somente após a clonagem e o sequenciamento do vírus Norwalk é que foi possível o desenvolvimento de métodos mais sensíveis de imunoensaio. Após a capacidade de expressar a proteína do capsídeo viral *in vitro* foi possível produzir partículas morfológicamente e antígenicamente similares aos NoV e SaV, as *virus-like particles*. Através da inoculação dessas partículas em animais obtêm-se soro hiperimune usado nos imunoensaios. O EIE que pode detectar antígeno viral em espécimes clínicos está disponível em número limitado de kits de diagnóstico comercial. EIEs que utilizam como antígeno *virus-like particles* são específicos, sensíveis e eficazes para a detecção de infecção pelos calicivírus humanos e têm sido utilizados em vários estudos soro-epidemiológico em grande escala (GREEN, 2007; SANTOS, SOARES, 2008).

A Microscopia Eletrônica continua a ser uma ferramenta valiosa para o diagnóstico de gastroenterite viral, pois é rápida e exige mínimo preparo das amostras. O exame direto de material de fezes não concentrado de surtos de gastroenterite (que ocorrem geralmente em crianças mais velhas e adultos), no entanto, é de valor limitado como uma ferramenta de diagnóstico de rotina para o

NoV porque as partículas estão geralmente presentes em baixas concentrações e podem ser difíceis de distinguir de outros objetos pequenos e redondos presentes nas fezes. A detecção de SaV em fezes por Microscopia Eletrônica pode ser menos difícil devido à sua morfologia distinta. Os *virions* são descritos com formato de estrela de seis pontas, com um buraco negro no centro (Estrela-de-davi). Os calicivírus, no entanto, podem apresentar aparência variável e apenas a sua morfologia não deve ser utilizado de forma conclusiva para distinguir entre SaV e NoV (GREEN, 2007).

2.2.2.5 Modelo de doença em animal e hospedeiros dos NoV e SaV

Inúmeras tentativas foram feitas para desenvolver um modelo de doença em animais que se assemelha a gastroenterite por NoV em humanos. Estudos realizados com chimpanzés demonstram que apesar de não desenvolver, o início e a duração de disseminação do vírus nas fezes e as respostas de anticorpos séricos foram semelhante à observada em humanos (BOK *et al.*, 2011). Um estudo de soroprevalência de 12 chimpanzés alojados em um centro de pesquisa de primata dos EUA, encontrando evidências de infecção por NoV em 11/12 (92%) dos animais, enquanto menor número de animais (17%) apresentou evidência de infecção por NoV GII (JIANG *et al.*, 2004). Nesse mesmo estudo, três espécies de macacos (*mangabey*, *pigtail*, e *rhesus*) apresentaram anticorpos para NoV humanos e evidências de infecção (mas não de doença) foi encontrada em macacos rhesus inoculados oralmente com NoV (ROCKX *et al.*, 2005). Ainda não está claro se as estirpes patogênicas de NoV são endêmicas em populações selvagens de PNH.

2.2.2.6 Características clínicas e tratamento das gastroenterites por NoV e SaV

A gastroenterite viral é geralmente considerada como leve e auto-limitada, embora a doença possa ser incapacitante durante a fase sintomática, que dura de 24 a 48 horas. A doença induzida pelo NoV tem sido ocasionalmente

suficientemente grave para necessitar de intervenção médica. Algumas pessoas com doença associada possuem risco aumentado de desenvolver a forma mais grave da doença. As manifestações clínicas observadas em surtos associados ao NoV incluem: náuseas e vômitos, diarreia, cólicas abdominais, cefaléia, febre (subjetiva), calafrios, mialgias e dor de garganta (sangue nas fezes não foi relatado). Nas crianças vômitos ocorreram com maior frequência do que a diarreia, enquanto nos adultos ocorreu o inverso. A duração da doença variou de duas horas a vários dias, com média entre 12 e 60 horas, podendo chegar a três dias. Não foram encontradas diferenças significantes para sexo e idade (MATTNER *et al.*, 2006; PANG, JOENSUU, VESIKARI; 1999; KAPLAN *et al.*, 1982). Num estudo na Finlândia, compararam-se as características clínicas das gastroenterites causadas pelo NoV ou SaV em lactentes e crianças jovens finlandesas. Foi constatado que os NoV têm como característica clínica predominante a indução de vômito, enquanto que nos SaV é a diarreia (PANG *et al.*, 2000).

Devido à gastroenterite causada por NoV ser autolimitada, a terapia oral de reposição fluidos e eletrólitos é geralmente suficiente para repor a perda de líquido. A administração parenteral de fluidos pode ser necessária se ocorrer vômitos ou diarreia severos. Contudo, a hospitalização por desidratação grave pode ocorrer. Além disso, os óbitos por gastroenterite devido ao NoV em pacientes idosos e debilitados, em crianças imunodeprimidas infectadas com calicivírus humanos foram relatados, no entanto, estas mortes foram consideradas como sendo causadas, em grande parte, por uma doença de base. Não existe um tratamento quimioterápico específico (GRENN, 2007, PATEL *et al.*, 2008).

2.3 A IMPORTÂNCIA DOS RV, NoV E SaV PARA A SAÚDE PÚBLICA

No Brasil, há a subrede de diagnóstico para detecção dos RV, implantada em todos os estados, e é formada por: 27 Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN), 1 Laboratório de Referência Nacional e 2 Laboratórios de Referência Regionais. Segundo os dados compilados do período de 01 de janeiro a 31 de dezembro de 2010 foram enviadas aos LACEN 2.275 amostras procedentes de 26 estados brasileiros e 1 Distrito Federal (100%), das quais 968 (43%) foram positivas

para RV. Os laboratórios que processaram maior número de amostras foram: Rio Grande do Sul com 21% (476), seguido de São Paulo 10% (228) e Amazonas 9% (196). A distribuição por estado mostra que a maior ocorrência de amostras positivas foi em São Paulo 16% (152), seguida do Rio Grande do Sul 11% (106) e do Paraná 9% (84) (BRASIL, 2010) (FIGURA 8).

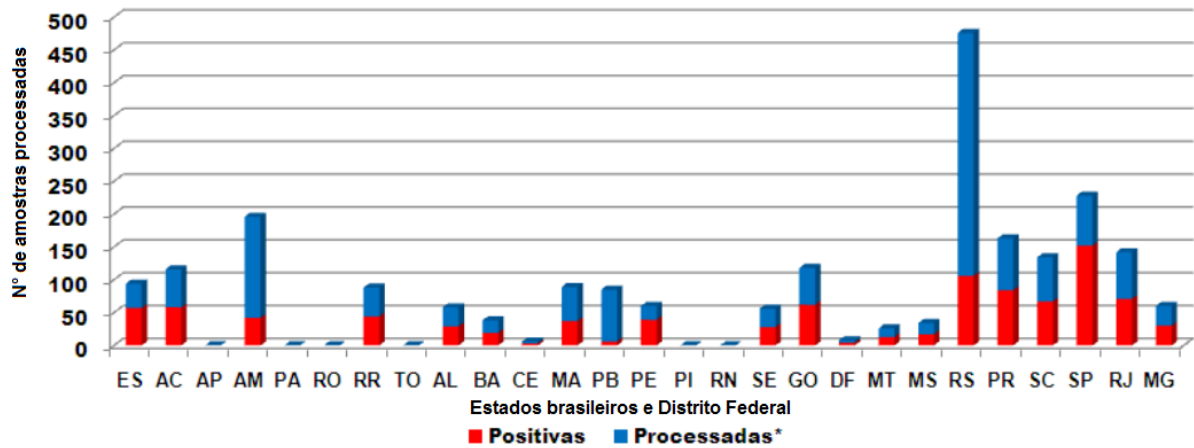


FIGURA 8 - NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS E PROCESSADAS, POR ESTADOS BRASILEIROS E DISTRITO FEDERAL, NA REDE DE LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO PARA ROTAVÍRUS, NO PERÍODO DE 01 DE JANEIRO A 31 DE DEZEMBRO DE 2010
 FONTE: BRASIL, 2010

No Estado do Paraná, desde Janeiro de 2009 até 18 de Outubro de 2011, os casos de RV e NoV são acompanhados pelo Centro de Informações e Respostas Estratégicas de Vigilância em Saúde, da Secretaria Estadual de Saúde do Paraná. No período de setembro e outubro/2010 houve um aumento significativo de número de casos de doença diarreica aguda causada por RV (PARANÁ, 2011) (FIGURA 9).

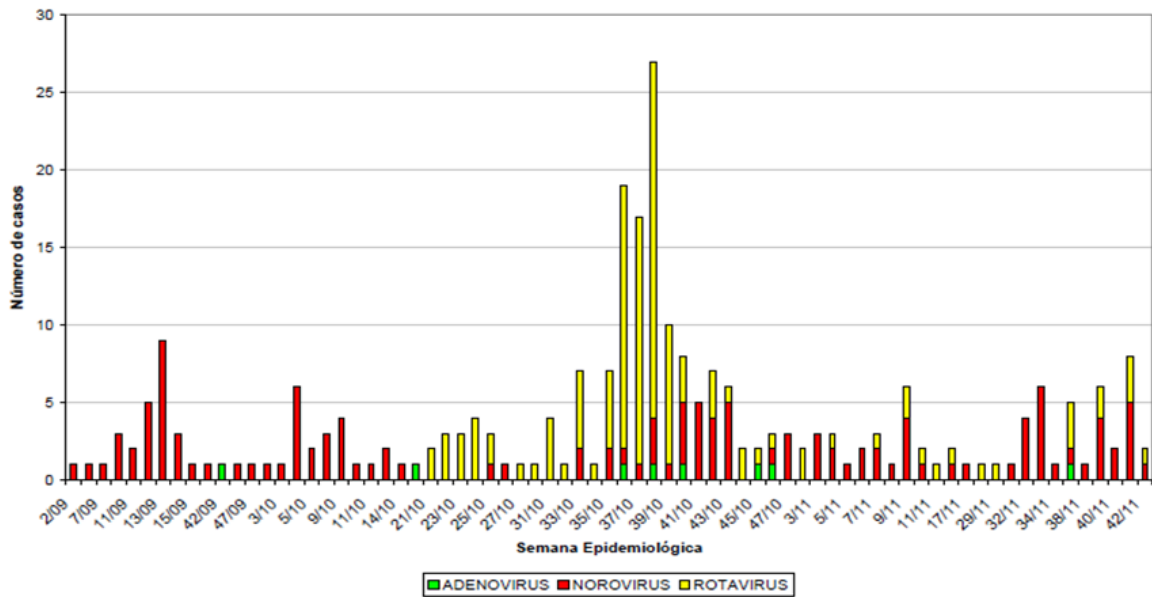


FIGURA 9 - EPIDEMIOLÓGICA DAS DOENÇAS DIARRÉICAS AGUDAS, CAUSADAS POR VÍRUS EM HUMANOS, NO PARANÁ, DE JANEIRO DE 2009 A OUTUBRO DE 2011
 FONTE: PARANÁ (2011)

No Estado de Santa Catarina, de 2000 a 2008 foram informados 638.588 casos de doenças diarréicas agudas, sendo que a idade, com maior freqüência, é há de 10 anos e a de maior incidência é a de menores de 01 ano. A partir de 2006 verifica-se queda na incidência em menores de 01 ano, que coincide com a disponibilidade da vacina para RV nas Unidades de Saúde. Em 2008 foram detectados 231 surtos de doenças diarréicas agudas e, foram identificados de 2003 a 2008, 38 surtos por RV. O aumento no número de casos de doenças diarréicas aguda ano a ano, sugere um aumento na vigilância das doenças diarréicas agudas, principalmente associadas à vigilância de surtos (SANTA CATARINA, 2009). No ano 2010 a porcentagem de óbitos por diarréia em crianças menores de 5 anos foi de 0,90%, em contraste com 2,1% em 2004, dois anos da introdução da vacina contra RV no calendário básico (BRASIL, 2011) (FIGURA 10).

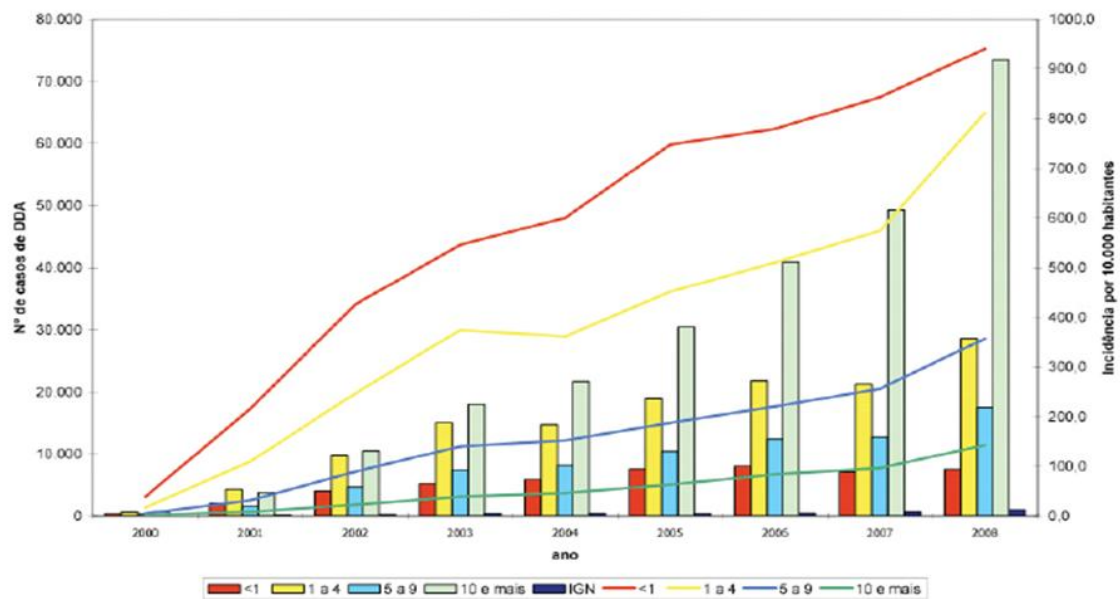


FIGURA 10 - NÚMERO DE CASOS DE DIARREIA EM HUMANOS – SANTA CATARINA, 2000 A 2008

FONTE: SANTA CATARINA, BRASIL (2009)

NOTA: DDA – doenças diarréicas agudas

IGN – ignorada

2.3.1 Epidemiologia dos RV, NoV e SaV: morbidade, mortalidade e principais genótipos envolvidos nas gastroenterites

- Rotavírus

Estima-se que anualmente ocorram 138 milhões de casos de gastroenterites por RV no mundo, principalmente em crianças menores de cinco anos, e mais de 500 mil óbitos por ano, sendo que mais de 80% dos casos fatais são em países em desenvolvimento (PARASHAR *et al.*, 2003).

A incidência da doença clínica em crianças entre 4-36 meses, que também estão em maior risco para doenças graves, necessita de hospitalização. As infecções por RV em adultos são geralmente subclínicas, mas, ocasionalmente, podem causar doença em pais de crianças com diarreia por RV, em pacientes imunocomprometidos (incluindo aqueles com HIV), em idosos, e viajantes a países em desenvolvimento. Em climas temperados, diarreia por RV ocorre predominantemente durante o outono e inverno, em ambientes tropicais e em países em desenvolvimento, a sazonalidade é menos acentuada (PARASHAR *et al.*, 1998).

Os RV grupo A são os maiores causadores de gastroenterite viral em crianças em todo o mundo (ESTES; KAPIKIAN, 2007). Os genótipos G (G1, G2, G3, G4) e os P (P[4] e P[8]) são os mais comumente encontrados em humanos no mundo (GENTSCH *et al.*, 1996). Recentemente, no entanto, as estirpes G9 têm emergido como sorótipos importantes em várias partes do mundo, como Gana, Índia e Brasil (ARMAH *et al.*, 2003; GENTSCH *et al.*, 2005). Além disso, as estirpes G8, também têm emergido como importantes linhagens em partes da África (GENTSCH *et al.*, 2005).

Uma recente revisão abrangente englobando 124 estudos publicados entre 1989 e 2004, a distribuição global dos sorótipos e genótipos de RV em 52 países em 5 continentes, que incluiu 45.571 amostras foi consistente com estudos anteriores. O sorótipo/genótipo G1 é o mais prevalente em todos os continentes e os tipos G1 a G4 são responsáveis por 97,5% de todas as infecções por RV em estudos na Ásia, América do Norte e Europa. A aplicação de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para genotipagem de VP4 tornou possível caracterizar amostras positivas a partir de investigações epidemiológicas. As estirpes P1A[8] ocorrem mais frequentemente, seguidas pelas estirpes P1B[4], apesar de várias combinações de sorótipos/genótipos G e P terem sido descritas. Uma revisão de 16.474 linhagens avaliadas tanto para VP7 e VP4 em 124 estudos indicou que havia quatro combinações predominantes P e G: P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 e P[8]G4 que compreendeu 88,5% das amostras (SANTOS; HOSHINO, 2005).

No Brasil, somente em 2006, ocorreram 2.236 óbitos por diarreia entre crianças menores de cinco anos e acredita-se que 40% destes podem estar associadas aos RV (BRASIL, 2006). Desde a primeira descrição de RV no Brasil (LINHARES *et al.*, 1977), vários estudos passaram a determinar a presença de RV em várias regiões do país (TIMENETSKY; SANTOS; GOUVEA, 1994; GURGEL *et al.*, 2008), confirmando intensa circulação viral. Em uma revisão abrangendo 117 estudos com 48.041 participantes, no Brasil, no período de 1986 a 2006 foram encontrados 51 combinações diferentes e a distribuição mudou ao longo do tempo (GURGEL *et al.*, 2008). Neste estudo foi possível constatar que o genótipo P[8]G1 foi o mais frequentemente encontrado, seguido por P[8]G9 e P[4]G2. Além disso, a taxa de detecção de P[8]G9 aumentou, enquanto que P[4]G2 diminuiu durante o período do estudo e ainda, foi constatada uma alta frequência de combinações de

genótipos G/P entre 1995 e 2000 e após estes anos a taxa de combinações diminuiu. Assim, a extraordinária diversidade genômica deste agente, revelada por novas técnicas de genotipagem, representa um desafio adicional à profilaxia da diarreia por RV (SANTOS; GOUVEA, 1997).

- Norovírus e Sapovírus

A maioria dos indivíduos de ambos os países desenvolvidos e em desenvolvimento mostram sinais de infecção por NoV antes da idade adulta, refletindo a distribuição global e à natureza endêmica dos vírus. A prevalência de anticorpos contra o grupo GII do NoV parece ser maior que o grupo GI na maior parte dos estudos (JIANG *et al.*, 2000).

Os SaV apresentam distribuição mundial. As taxas de prevalência de anticorpos para adultos no Japão, Canadá, Estados Unidos, China, Cingapura, Indonésia e Papua-Nova Guiné variou de 70% a 100% (GREEN, 2007).

O principal papel do NoV como agente de epidemia de gastroenterites tem sido confirmado em vários locais em todo o mundo, e, eles são uma das causas mais importantes de surtos de gastroenterites não bacterianas. Em uma análise de 233 surtos de gastroenterites não bacterianas notificados ao *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), entre julho de 1997 e junho de 2000, 217 (93%) foram associados com os NoV (FANKHAUSER *et al.*, 2002). Em uma pesquisa maior, com 3.714 surtos de gastroenterites não bacterianas que ocorreu na Europa entre 1995 e 2000, 85% estavam associados com o NoV (LOPMAN *et al.*, 2003). Os surtos ocorrem com frequência em hospitais, acampamentos, áreas de lazer, escolas, creches, cruzeiros, centros de retiro, asilos, colégios, restaurantes, eventos sociais, com serviço de refeições, em famílias, entre militares. Surtos podem variar de tamanho, envolvendo pequenos grupos familiares para centenas de indivíduos. Têm-se notado um pico sazonal de surtos de NoV nos meses mais frios do ano, mas picos em meses mais quentes foram descritos (INOUYE *et al.*, 2000; LOPMAN *et al.*, 2003b).

O papel do NoV em surtos relacionados à alimentação de gastroenterite é alarmante. Estima-se que 23 milhões de casos de doenças por NoV ocorrem nos Estados Unidos anualmente, sendo que 40% delas são transmitidas por alimentos (MEAD *et al.*, 1999). A introdução de técnicas novas como a RT-PCR permitiram

estimar melhor o papel dos NoV em doenças transmitidas por alimentos. A análise de 8.271 surtos de origem alimentar relatados ao CDC (1991-2000) mostrou que os surtos por NoV foram muitas vezes maiores (cerca de mais de 50%) do que os surtos por bactérias. Vários veículos de fonte comum de origem alimentar estão relacionados em surtos de NoV: produtos de padaria, saladas, alimentos frios, gelo comercial e água (WIDDOWSON *et al.*, 2005a).

Os NoV foram associadas à infecção e doença em todas as faixas etárias, embora a maioria dos surtos de gastroenterite ocorra em contextos que envolvem idosos, crianças em idade escolar e adultos. Apesar de não ser conhecido o papel preciso do NoV em populações pediátricas, um número crescente de estudos sugere que seu papel na gastroenterite aguda pode ser o segundo em importância, após o rotavírus. Um estudo recente realizado em três hospitais pediátricos nos Estados Unidos por um período de dois anos foram identificados NoV em 131 (7,1%) de 1.840 crianças sintomáticas (até 5 anos de idade) hospitalizadas por gastroenterite aguda (ZINTZ *et al.*, 2005). Nos casos de gastroenterites em idosos, os NoV foram associados àqueles que vivem em ambientes institucionais como lares de idosos (FANKHAUSER *et al.*, 2002).

Os SaV são associados com gastroenterites pediátricas, mas raramente exige hospitalização devido à gastroenterite grave (GREEN, 2007).

Estudos epidemiológicos moleculares demonstraram uma notável diversidade genética entre os NoV em circulação. A tipagem genética de estirpes circulantes é uma ferramenta útil na elucidação da origem e propagação de epidemias. Sistemas de tipagem genética de NoV foram propostas com base na proteína de capsídeo VP1, que presumivelmente se correlaciona com a especificidade antigênica, e na seqüência parcial do capsídeo. Um desses sistemas divide o gênero NoV em cinco grandes clados filogenéticos, ou genogrupos, designado de GI a GV. Genogrupos I, II e III estão subdivididos em 8, 19, e três grupos genéticos (ou genótipos), respectivamente (ZHENG *et al.*, 2006).

Na Europa, no período de 2000 a 2005, um estudo epidemiológico constatou que o genogrupo GII foi predominante, especificamente aquelas do *cluster* GII.4, e esse padrão reflete estudos em outras partes do mundo (PATEL *et al.*, 2008).

Com base na diversidade genética existente entre os SaV e um sistema de tipagem genética com base nas seqüências do gene VP1 foi proposta a

caracterização em cinco genogrupos, denominados de GI a GV (FARKAS *et al.*, 2004).

Evidências de infecções mistas no mesmo indivíduo ou dentro do mesmo foco foram relatadas (LODDER *et al.*, 1999; GRAY *et al.*, 1997). Tais infecções diversas e mistas podem permitir a recombinação entre genomas de RNA, uma possibilidade sugerida recentemente a partir da análise de seqüências de NoV ocorrendo em várias espécies de animais (BULL *et al.*, 2005).

O significado biológico e epidemiológico da diversidade genética entre os NoV e outros calicivírus humanos exige um estudo mais aprofundado. Esses estudos são necessários pois as relações antigênicas ainda não podem ser definidas pela neutralização e não se sabe como a aparente diversidade genética do norovírus terá impacto no desenvolvimento de vacinas (GREEN, 2007).

2.3.2 Considerações sobre prevenção contra infecções por RV, NoV e SaV

- Rotavírus

Devido ao fato do RV infectar praticamente todas as crianças com até 5 anos de idade, tanto em países industrializados como em desenvolvimento, medidas como melhoria da qualidade da água, alimentos e saneamento básico não são suficientes para reduzir a incidência da doença. Assim, a pesquisa por um modelo vacinal tornou-se imprescindível e, para maior eficácia da vacina é necessário o estudo dos diferentes genotipos/sorotipos circulantes nas diferentes regiões (PARASHAR *et al.*, 1998). O desenvolvimento de vacinas contra o RV baseado em ou imunidade heterotípica ou sorotipo-específico levou muitos países a criar programas para avaliar a incidência de doenças diarréicas associadas com a infecção por RV e a distribuição destas estirpes. A vigilância epidemiológica quanto às estirpes circulantes ajudam a determinar quais delas é mais prevalente e serão melhor abrangidas pelos antígenos encontrados nas vacinas atuais. Após a introdução de uma vacina, esta vigilância ajuda a detectar quais estirpes não podem ser abrangidas pela vacina. Em quase duas décadas, estudos demonstraram que os quatro sorotipos de RV mais importante no mundo (G1-G4) representam mais de

90% das estirpes em circulação. Posteriormente, estes quatro sorotipos foram usados no desenvolvimento de vacinas recombinantes baseadas na imunidade sorotipo-específicas. Mais recentemente, através das técnicas mais avançadas de genotipagem confirmou a importância dos quatro tipos comuns a nível mundial, porém novas estirpes foram identificadas. A enorme diversidade e capacidade de RV humano em sofrer mudanças sugerem que as vacinas devem fornecer proteção heterotípica para serem plenamente eficazes (GENTSCH *et al.*, 2005).

A estratégia atual é baseada no uso da vacina para RV com o vírus vivo e atenuado induzindo a uma imunidade comparada àquela produzida pela infecção natural, conferindo imunidade homotípica ou heterotípica contra a diarreia severa causada pelos principais sorotipos de RV em circulação (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001). Os desenvolvimentos de vacinas se baseiam em amostras humanas e animais recombinantes contendo os antígenos em comuns. (GENTSCH *et al.*, 2005).

No Brasil em 2006, foi introduzido a Vacina de Rotavírus Humano (VORH) no Calendário Básico de Imunizações para crianças e é dirigida à população de menores de seis meses de idade para proteger antecipadamente as crianças da faixa etária de 6 a 24 meses, nas quais se observa a maior carga de complicações decorrentes da infecção pelo RV. A VORH foi licenciada no mercado internacional em julho de 2004 e no Brasil foi licenciada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em julho de 2005. No mercado internacional, esta vacina foi licenciada com o nome comercial de Rotarix® e é uma vacina elaborada com vírus isolados de humanos e atenuados para manter a capacidade imunogênica, porém não patogênica. **A vacina é monovalente, pois possui apenas um sorotipo em sua composição que é o G1P[8] da estirpe RIX4414.** Segundo estudos de eficácia na América Latina (Brasil, México e Venezuela) a VORH mostrou capacidade protetora contra gastroenterite em geral por RV, gastroenterite grave RV e hospitalizações devido à gastroenterite por RV de 62,9%, 78,3% e 86,0%, respectivamente. A vacina é especialmente eficaz na prevenção de doença por RV da tipo G1, mas os estudos mostraram que houve proteção cruzada para gastroenterite e gastroenterite grave causada por outras estirpes não-G1 (G2, G3, G4 e G9) (BRASIL, 2005).

- Norovírus e Sapovírus

Um dos grandes obstáculos para a formulação de uma estratégia de imunização contra NoV e SaV é que a base para a imunidade ainda não é compreendida. A incapacidade de cultivar esses vírus em cultura de células tem impedido uma análise do papel dos anticorpos neutralizantes. Além disso, o vírus em si não pode ser propagado como uma fonte de vacinas vivas ou inativadas. Este último problema pode ser contornado pela disponibilidade atual de antígenos de capsídeo obtidos a partir das *virus- like particles*. Uma vacina segura e eficaz poderia reduzir a incidência de epidemia de gastroenterite viral, também seria de especial importância para os estudantes universitários, militares, residentes de enfermagem, e os indivíduos em diferentes contextos institucionais. Além disso, pode reduzir o número de episódios de gastroenterite em crianças, o que pode ser de maior importância para os países em desenvolvimento. Embora a gastroenterite por NoV tenda a ser uma doença benigna, uma redução de episódios de diarreia podem ser importantes nas crianças debilitadas e desnutridas. Pois se sugere que episódios repetidos de diarreia podem ser um fator agravante no desenvolvimento da desnutrição devidos aos danos causados à mucosa intestinal (GREEN, 2007).

2.4 AS DOENÇAS INFECCIOSAS EMERGENTES, AS ZONÓSES E OS ANIMAIS SILVESTRES

As doenças infecciosas emergentes são doenças de origem infecciosa, cuja incidência, tende a aumentar, ou é previsível que aumente (COCKERILL; SMITH, 2004). Nos últimos anos, episódios de doenças emergentes têm aumentado globalmente. A lista destas doenças é impressionante e, devido ao conhecimento sobre a ecologia das doenças, continuará a crescer. Quase todos os episódios destas doenças emergentes envolvem agentes zoonóticos infecciosos, ou seja, a transmissão do agente etiológico para o homem a partir de um reservatório contínuo em seu ciclo de vida em animais, sem o estabelecimento permanente de um novo ciclo de vida nos seres humanos (MURPHY, 1998).

As doenças infecciosas emergentes de animais silvestres de vida livre

podem ser classificadas em três grandes grupos com base em critérios epidemiológicos:

(1) associadas com o aumento da população de animais domésticos junto às populações de animais silvestres;

(2) relacionadas diretamente à intervenção humana, através de translocações do hospedeiro ou parasita;

(3) sem evidente envolvimento de animais domésticos ou seres humanos.

Estes fenômenos têm duas grandes implicações biológicas: (1) muitas espécies de animais selvagens são reservatórios de patógenos que ameaçam a saúde de animais domésticos e dos humanos; (2) doenças infecciosas emergentes de animais selvagens representam uma grande ameaça para a conservação da biodiversidade global. O aumento do número de doenças infecciosas emergentes oriundas de animais selvagens pode refletir o aumento da vigilância das mesmas. Relações entre fatores causais e o surgimento de doenças infecciosas emergentes em seres humanos e animais selvagens indicam que essa tendência é válida (FIGURA 11).

As doenças emergentes mais frequentemente resultam de uma mudança na ecologia do hospedeiro, do patógeno ou de ambos. A população humana em expansão tem impulsionado o surgimento de doenças infecciosas emergentes, especialmente em áreas urbanas (dengue, cólera), e usurpação do habitat dos animais selvagens. Essa invasão pode ter sido um fator chave na África para a emergência global do vírus Marburg e Ebola e o vírus da imunodeficiência humana, por exemplo (DASZAK, CUNNINGHAM, HYATT; 2000).

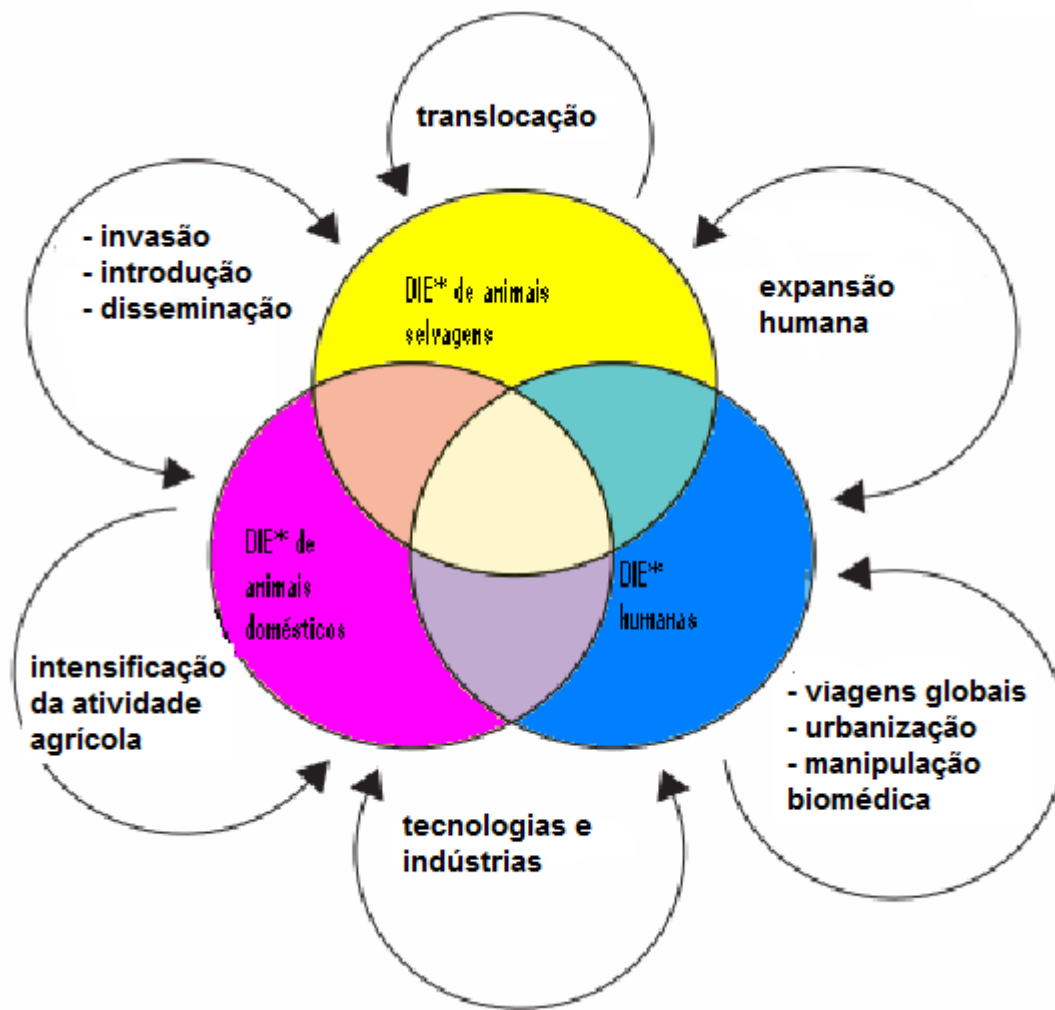


FIGURA 11 - ESQUEMA DA ECOLOGIA *CONTINUUM* ENTRE HOSPEDEIRO E PARASITA, AS SETAS INDICAM ALGUNS DOS FATORES DETERMINANTES PARA O SURGIMENTO DE UMA DOENÇA

FONTE: Adaptado DASZAK; CUNNINGHAM e HYATT; (2000)

NOTA: DIE - Doenças infecciosas emergentes

Zoonoses são doenças naturalmente transmitidas de animais vertebrados para humanos, e vice-versa, estas doenças representam um problema de Saúde Pública mundial. A OMS classifica como zoonose todas as doenças, ou infecções naturalmente transmissíveis entre animais vertebrados e os seres humanos, sendo que mais de 200 delas, ou 80% das doenças transmissíveis a humanos, enquadram-se dentro desta classificação (OMS, 2011). Assim, os animais desempenham um papel essencial na manutenção das infecções zoonóticas na natureza. As zoonoses podem ser bacterianas, virais ou parasitárias, ou podem envolver agentes não convencionais. Muitas das doenças infecciosas emergentes são zoonoses (KAHN, 2006). As doenças infecciosas emergentes, como as gastroenterites, prejudicam a economia global e a Saúde Pública de forma significativa causando grande impacto

em fatores sócio-econômicos, ambientais e ecológicos. **Cerca de 60% das doenças infecciosas emergentes são zoonoses e destas mais de 70% são originárias de animais de vida livre e a tendência é aumentarem significativamente ao longo do tempo (JONES et al., 2008).** A maioria das enfermidades que surgiram ou ressurgiram no mundo que acometem os seres humanos procederam de novos patógenos oriundos de animais ou de produtos de origem animal. Os animais de vida livre (PNH, morcegos, roedores), bem como animais de tração (cavalos) e animais destinados à alimentação (aves, gado) foram implicados no ciclo epidemiológico dessas doenças. Muitos dos agentes responsáveis por novas infecções e doenças nos seres humanos são as viroses (hantavíruses, rotavíruses), porém bactérias (por exemplo, *Salmonella* e *Escherichia coli*) e protozoários (*Cryptosporidium*) de origem animal, também estão envolvidos em surtos em alimentos e águas de superfície contaminados. O caráter zoonótico de algumas outras doenças humanas, como o Ebola e a nova forma variante da doença *Creutzfeldt-Jakob*, ainda não foram completamente elucidados. Tanto nos países em desenvolvimento e nos industrializados, uma série de zoonoses tem emergido, como novas patologias ou agentes já conhecidos, mas em áreas ou espécies em que não tinham sido relatados previamente. Além disso, algumas zoonoses reapareceram após muitos anos de ausência (MESLIN, 1997).

2.4.1 Aspectos zoonóticos dos RV

O aspecto zoonótico do RV é demonstrado por vários estudos de caso, indicando a infecção por RV humanos em animais, e vice-versa. A comparação entre algumas seqüências genéticas dos RV humanos e animais demonstrou alta similaridade entre eles. Através do monitoramento de RV em circulação na população humana, revelou a presença de vários genótipos incomuns, em seres humanos e em diferentes partes do mundo. Muitas estirpes de RV humanos foram encontrados em animais domésticos, fornecendo evidências de que os animais podem atuar como uma fonte de multiplicação do vírus e/ou de material genético para a diversificação de RV humano. Estes resultados justificam que os RV devem ser considerados como potenciais patógenos zoonóticos (SANTOS; HOSHINO,

2005; GENTSCH *et al.*, 2005).

Os RV são conhecidos por infectar um grande número de espécies de animais, incluindo seres humanos e animais domésticos. Algumas pesquisas anteriores sobre a prevalência de anticorpos contra o RV em mamíferos vivendo em zoológicos ou mamíferos silvestres em cativeiro revelaram soropositividade em uma grande variedade de animais, indicando a susceptibilidade à infecção RV (PETRIC *et al.*, 1981). Outro estudo atual detectou RV em animais selvagens e animais vivendo em zoológicos (CORIA-GALINDO *et al.*, 2009). No entanto, existem poucos relatos sobre a caracterização dos RV que infectam os animais selvagens.

Nas últimas décadas, os agentes infecciosos que se originaram em animais selvagens se tornaram importantes em todo o mundo devido ao aumento do contato humano com os animais domésticos e silvestres. Uma vez que esses patógenos tiveram impactos significativos na saúde humana, na produção agrícola, na economia e conservação da vida selvagem, é importante estimar quais os tipos de patógenos existentes em animais selvagens na sociedade humana (JONES, *et al.*, 2008).

O genotipo G, tipicamente de animais, como bovinos e suínos, têm sido encontrados em humanos, assim como muitos genotipos característicos de infecções humanas, têm sido descritos em animais (SANTOS *et al.*, 1998). O sorotipo G3 tem sido encontrado em várias espécies animais, como leporinos, murinos, caninos, eqüinos, bovinos, suínos e PNH, ocorrendo também em humanos (OTSYULA *et al.*, 1996; KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001).

A doença diarréica é uma das principais causas de morbidade em macacos, e está associado com alta mortalidade em algumas colônias de PNH. Num estudo realizado em 2006, foram examinados os agentes virais em amostras de fezes de macacos com diarréia em dois centros de pesquisa na China e nos Estados Unidos e, na colônia chinesa a presença de RV foi relativamente comum (WANG *et al.*, 2007). Como os seres humanos e PNH compartilham características genéticas e fisiológicas semelhantes, os RV isolados de PNH têm recebido atenção especial, sendo amplamente utilizado tanto em pesquisa básica e aplicada contra o RV. Por exemplo: a estirpe SA11 isolada de macacos *vervet* saudáveis na África do Sul em 1958 e cultivada de forma eficiente em cultura de células foi um protótipo da estirpe RV do grupo A e desempenhou um papel central na compreensão da biologia molecular do vírus. Outro exemplo é a estirpe MMU18006 isolada de fezes diarréicas

de macaco rhesus nos Estados Unidos em 1979 é o sorotipo 3 componente de uma vacina quadrivalente (sorotipo 1, 2, 3 e 4), que foi a primeira vacina contra o RV humano licenciado nos Estados Unidos (HOSHINO *et al.*, 2006).

Embora várias espécies de PNH tenham desempenhado um papel indispensável na pesquisa básica, bem como no desenvolvimento de vacinas e de muitas doenças infecciosas do homem, tais como HIV e hepatite viral, apenas cinco estirpes do RV símio foram relatados: a estirpe de SA11 de RV no macaco vervet (*Chlorocebus pygerythrus*), as estirpes MMU18006 e MMU17959 de RV no macaco rhesus (*Macaca mulatta*) a estirpe YK-1 de RV no macaco rabo de porco (*Macaca nemestrina*), (WESTERMAN *et al.*, 2005), a estirpe TUCH de RV no macaco rhesus (McNEAL *et al.*, 2005). Algumas espécies de PNH em que já foram detectados RV são as seguintes: *Macaca nemestrina* (macaco rabo de porco), *Papio sp* (babuíno), *Macaca mulatta* (Macaco rhesus), *Cercopithecus aethiops* (macaco vervet ou macaco verde), *Gorilla G. gorilla* (gorila). Uma das principais razões por que temos tão poucos RV em PNH pode ser devido à falta de vigilância neste campo (HOSHINO *et al.*, 2006).

2.4.2 Aspectos zoonóticos dos NoV e SaV

Os NoV bovinos foram identificados em 1976 (*Newbury* agente 1) e 1980 (vírus *Jena*) em fezes de gado com diarreia (WOODE; BRIDGER, 1978). Por outro lado os NoV suínos foram detectados na Noruega e em amostras de fezes de porcos clinicamente saudáveis no Japão. Outros representantes dos NoV animais são os NoV murinos isolados durante uma infecção em camundongos imunodeprimidos. Recentemente, os NoV com tropismo para o trato intestinal foram descritos em um filhote de leão em cativeiro e num filhote canino, em ambos os casos, os animais apresentaram enterite (BANK-WOLF; KÖNIG; THIEL, 2010).

Dentre os SaV em animais foram identificados em suínos e em *mink*. Uma estirpe de SaV entérico suíno, *Cowdens*, foi isolada de fezes de leitões de 27 dias de idade (SAIF *et al.*, 1980). O SaV entérico em *mink* foi detectado durante um surto de diarreia em uma fazenda nos Estados Unidos (GUO; EVERMANN; SAIF, 2001).

A infecção dos seres humanos com SaV e NoV ocorre principalmente

através de água ou alimentos contaminados, e de pessoa-a-pessoa. Se a transmissão através dos alimentos de origem animal ou pelo contato com animais doentes é possível, ainda está incerto (BANK-WOLF; KÖNIG; THIEL, 2010).

Anticorpos contra NoV bovino foram detectados em amostras de soro humano através de EIE baseado em NoV bovino recombinante (WIDDOWSON *et al.*, 2005b). Anticorpos contra NoV humanos foram encontrados em suínos e em macacos (FARKAS *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2004). A realização de infecção experimental em PNH com NoV humanos foi um sucesso em macacos rhesus (*Macaca mulatta*) Porém não houve liberação de níveis detectáveis do vírus em sagüis (*Callithrix jacchus*), micos da cabeça branca (*Saguinus oedipus*) e macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Não ocorreram sintomas clínicos em nenhum dos animais, embora o inóculo utilizado mostrasse infectar seres humanos voluntários e induzir doença (ROCKX *et al.*, 2005)

Até a presente data, poucos genomas completos de NoV e SaV animais foram publicados para entender melhor o relacionamento com os vírus que causam doença em seres humanos. De grande interesse para pesquisadores é a possibilidade de transmissão zoonótica dos NoV. NoV animais são geneticamente próximos às estirpes humanas, especialmente NoV suíno. A similaridade entre a seqüência das estirpes suínas e bovinas com humanas sugere que possa haver um reservatório animal de infecção NoV. A co-infecção e recombinação entre estirpes humanas e animais podem ocorrer, embora ainda não tenham sido detectadas. Os surgimentos de estirpes recombinantes têm maior probabilidade de ocorrer onde o contato entre humanos e animais é mais intenso (SCIPIONI *et al.*, 2008).

2.5 PRIMATAS NÃO HUMANOS NO MUNDO E NO BRASIL

De acordo com a classificação taxonômica, a Ordem Primates está dividida em duas Subordens Haplorhini e Anthropeidea. Das Subordens Haplorhini deriva a Infraordem Prosimii e da Anthropeidea deriva duas Infraordens: (1) Platyrrhini ou primatas neotropicais ou do Novo Mundo se localizam nas Américas Central e do Sul; (2) Catarrhini ou primatas do Velho Mundo se localizam na África e na Ásia (AURICCHIO, 1995) (FIGURA 12).

Comparação entre alguns primatas			
	HOMEM	CHIMPANZÉ	MACACO-PREGO
Reino	Animalia	Animalia	Animalia
Filo	Chordata	Chordata	Chordata
Classe	Mammalia	Mammalia	Mammalia
Ordem	Primates	Primates	Primates
Subordem	Anthropoidea	Anthropoidea	Anthropoidea
Infraordem	Catarrhini	Catarrhini	Platyrrhini
Família	Hominidae	Pongidae	Cebidae
Gênero	Homo	Pan	Cebus
Espécie	<i>Homo sapiens</i>	<i>Pan troglodites</i>	<i>Cebus apella</i>

FIGURA 12 - ESQUEMA REPRESENTADO A CLASSIFICAÇÃO DE ALGUNS PRIMATAS
 FONTE: AURICCHIO (1995)

Os primatas sobrevivem nas regiões equatoriais de três continentes – desde as florestas tropicais do sul do México até a fronteira norte da Argentina; do grande arquipélago da Indonésia até as montanhas do sudoeste da China; da África Subsaariana à África do Sul (FIGURA 13). Atualmente reconhece-se que existam pelo menos 361 espécies de primatas, com centenas de subespécies. Continuamente novas espécies de primatas estão sendo descritas, somente no ano de 2005 cinco novas espécies foram catalogadas (*INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE - IUCN, 2011*).



FIGURA 13 - OCORRÊNCIA DE PRIMATAS NÃO HUMANOS NO MUNDO
 FONTE: AURICCHIO (1995)

NOTA: Platyrrhini = Primatas do “Novo Mundo”; Catarrhini = Primatas do “Velho Mundo”

Os PNH neotropicais (encontrados no Brasil), PNH do Novo Mundo ou Platyrrhini têm características distintas das apresentadas pelos PNH do Velho Mundo ou Catarrhini. Os PNH do Velho Mundo ou Catarrhini localizam-se principalmente na Ásia e na África. Os Platyrrhini possuem as narinas voltadas para os lados, num nariz achatado e focinho relativamente curto. Possuem hábitos totalmente arborícolas, raramente descendo ao chão. A capacidade de preensibilidade da cauda é notada em alguns gêneros (*Alouatta*, *Ateles*, *Lagothrix* e *Brachyteles*). A grande variação de volume corpóreo destes animais é reconhecida como o mais forte indicador das adaptações fisiológicas, ecológicas e comportamentais que um animal possa apresentar. Os gêneros que mais têm sido associados com a ocorrência de epizootias no Brasil são *Alouatta*, *Cebus* e *Callithrix* (AURICCHIO, 1995). **O Brasil possui a maior diversidade de PNH do mundo**, tendo aproximadamente 127 espécies, muitas das quais são nativas, a maioria vivendo na região Amazônica (BRASIL, 2011).

Na (TABELA 1) estão resumidas exemplos de espécies de primatas não humanos em que já foram pesquisadas infecções por RV. Todas as espécies de primatas não humanos destes casos são do Velho Mundo e permaneciam em cativeiro (WANG *et al.*, 2006).

TABELA 1 – EXEMPLOS DE ESPÉCIES DE PRIMATAS NÃO HUMANOS EM QUE FORAM INVESTIGADOS A PRESENÇA DE ROTAVÍRUS

ESPÉCIE	LOCAL	AMOSTRAS		MÉTODO DIAGNÓSTICO
		ANALISADAS	POSITIVAS	
<i>Macaca mulatta</i>	China	79	16	EIE
<i>Macaca fascicularis</i>	China	2	10	EIE
<i>Macaca nemestrina</i>	China	3	0	EIE
<i>Macaca fascicularis</i>	EUA	12	0	EIE
<i>Macaca nemestrina</i>	EUA	48	0	EIE

FONTE: Adaptado de WANG *et al.*, (2011).

NOTA: EIE - Ensaio Imunoenzimático

No estado do Paraná, apesar de alguns esforços pontuais, poucas são as

informações sobre a distribuição e ocorrência dos PNH. Segundo Passos *et al.*, 2007 foram registrados sete espécies de PNH no estado do Paraná: *Cebus nigrinus*, *Alouatta guariba clamitans*, *A. caraya*, *Brachyteles arachnoides*, *Leontopithecus caissara*, *Callithrix jacchus* e *C. penicillata*, dentre as quais, as duas últimas como ocorrências a partir de introduções. As (FIGURAS 14 e 15) mostram a distribuição de alguns gêneros destes animais no Paraná.

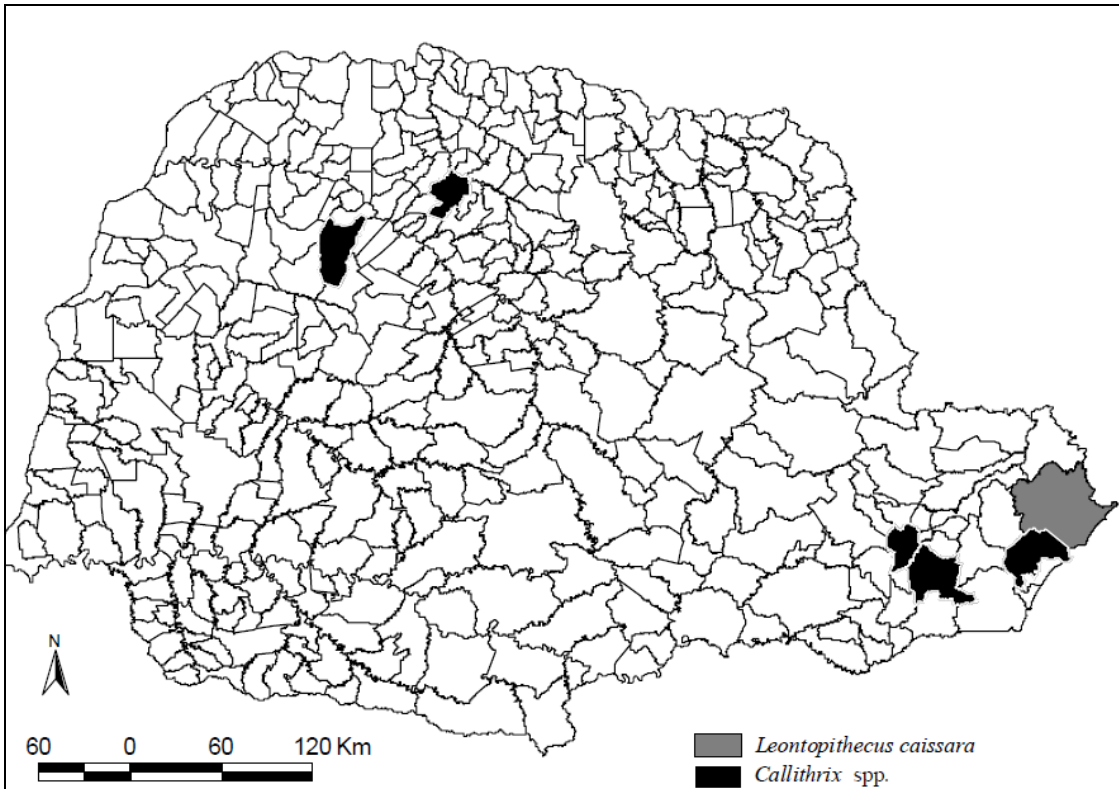


FIGURA 14 - MUNICÍPIOS COM A OCORRÊNCIA DE Callitrichidae NO ESTADO DO PARANÁ
 FONTE: PASSOS *et al.*, 2007.

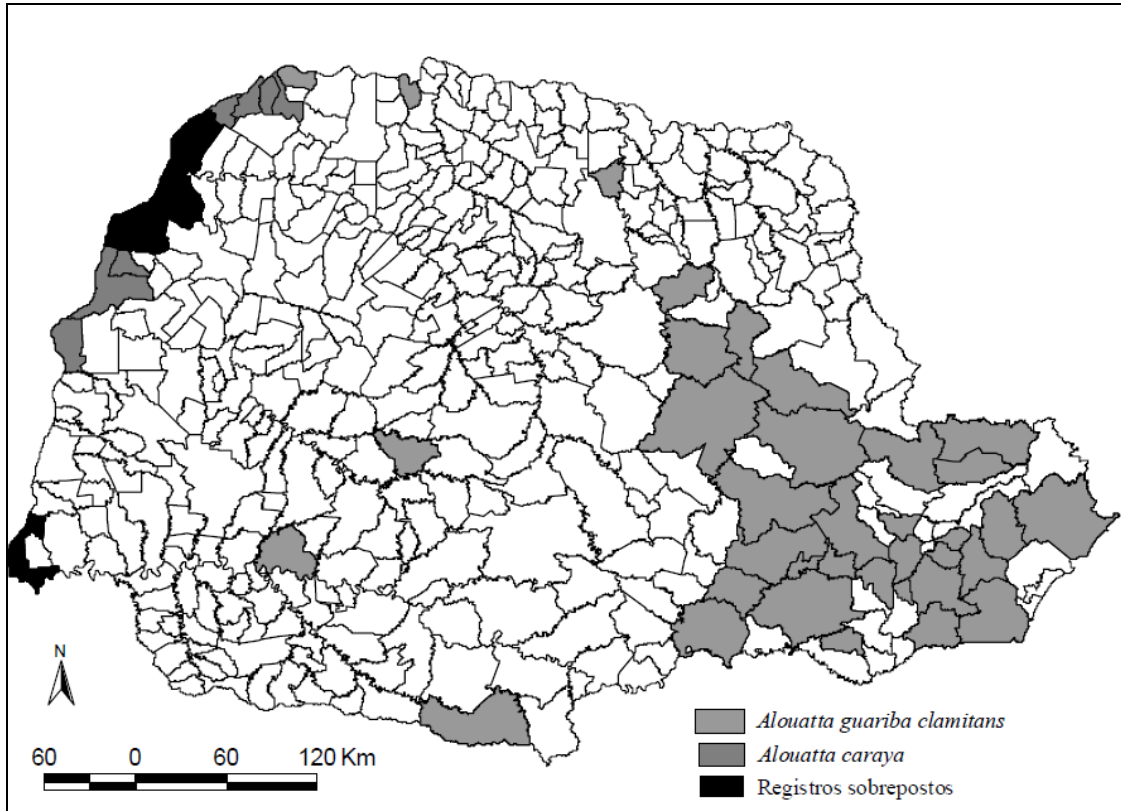


FIGURA 15 - MUNICÍPIOS COM A OCORRÊNCIA DE Atelidae, Alouattinae NO ESTADO DO PARANÁ
 FONTE: PASSOS *et al.*, 2007.

No estado de Santa Catarina, assim como no restante do Brasil, são escassos os estudos sobre ocorrência de primatas. Em Santa Catarina, relata-se a presença das espécies *Alouatta guariba clamitans*, *Cebus nigrinus* e *Callithrix penicillata* (introduzido) (BRASIL, 2011).

2.6 A IMPORTÂNCIA DOS PRIMATAS NÃO HUMANOS EM SAÚDE PÚBLICA

Os animais silvestres são importantes reservatórios nos ciclos epidemiológicos das diversas zoonoses existentes, podemos considerar os PNH como animais “sentinelas naturais” para investigação de determinadas epizootias, ou seja, epidemias entre os animais, de interesse à Saúde Pública. Considerando o meio ambiente e suas condições propícias para a manutenção de diversos ciclos epidemiológicos, vários agentes etiológicos podem estar envolvidos em epizootias acometendo PNH entre eles vírus, bactérias, protozoários, rickettsias, fungos e

parasitas. As viroses destacam-se pelas suas características epidemiológicas (SOUZA, 2007; SVOBODA, 2007).

A grande proximidade filogenética entre humanos e PNH permite a existência de agentes etiológicos comuns, tornando-os ótimos modelos experimentais, permitindo o estudo de várias doenças. Porém, tal aproximação pode trazer riscos à saúde de ambos, na forma de patógenos zoonóticos. Várias enfermidades comuns aos humanos e PNH já foram descritas como: Febre amarela, Dengue 1 a 4, Hepatite viral A, Raiva, Leptospirose, Toxoplasmose e ainda as doenças entéricas como as gastroenterites causadas por Rotavírus, *Salmonella* e *Cryptosporidium*. Estas doenças são causas de grande morbi-mortalidade entre PNH, principalmente os que estão em cativeiro (*WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH* - OIE, 2007; SVOBODA, 2007).

Utilizando-se a Febre Amarela (FA) como exemplo, sabe-se que a associação de vertebrados e vetores potenciais em um habitat favorável em densidades ótimas constitui um fator fundamental para a persistência do vírus amarílico. No entanto, dúvidas persistem em relação ao tamanho ótimo das populações de mosquitos. Além disso, ainda não se sabe se as populações de primatas apresentam contingências suficientes para a manutenção do vírus no ciclo silvestre da doença (VASCONCELOS *et al.*, 2001). Além do mais, estudos que visem à análise das condições de saúde dos primatas em vida livre e que impliquem na necessidade de capturá-los, defrontam-se imediatamente com problemas de quantificação de uma amostragem animal significativa a ser capturada. Um primeiro passo para amenizar os problemas de ambos os casos seria a realização de estudos em populações e comunidades dos primatas em um determinado tempo e espaço para quantificar os parâmetros que reflitam as informações necessárias (AGUIAR, 2006). Com base em princípios de ecologia médica, Ávila-Pires (2000) salienta que a correta avaliação do papel de hospedeiros não humanos na manutenção de enfermidades requer o cálculo estimativo da população de animais em uma determinada área, o estudo de sua dinâmica populacional e a análise da estrutura e funcionamento das comunidades que integram. Neste sentido, quando houver necessidade de se realizar o controle racional de uma doença em que animais silvestres estejam envolvidos, é fundamental o conhecimento detalhado da(s) espécie(s) envolvida(s) como índices de densidade populacional, biologia, hábitos e circulação destes animais (AGUIAR *et al.*, 2005; AGUIAR, 2006).

No Brasil, segundo a Lei n 8.080, de 19 de setembro 1990, que regulamenta o Sistema Único de Saúde (SUS) , define: “Vigilância epidemiológica é o conjunto de ações que proporciona o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças e agravos” (BRASIL, 1990).

Em vista disso, políticas públicas estão sendo criadas visando o controle e a prevenção de doenças, como a Portaria n. 104, de 25 de janeiro de 2011 que informa no anexo II: “doenças e agravos de notificação compulsória: IV. Epizootias e/ou morte de animais que podem preceder a ocorrência de doenças em humanos: a) Epizootias em PNH; b) Outras epizootias de importância epidemiológica” (BRASIL, 2011). Desta forma, as notificações de epizootias em PNH devem ser realizadas pelos serviços de saúde pública, constituindo grande avanço para a vigilância epidemiológica das zoonoses de interesse envolvidas nestes eventos

2.6.1 Aplicabilidade da vigilância de epizootias em PNH na Saúde Pública

A vigilância de epizootias em PNH tem sua origem e importância dentro da vigilância epidemiológica da febre amarela, conforme documentos técnicos do Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 1999; BRASIL, 2005). Nestes documentos há inferência sobre a atenção que se deve ter em relação à mortalidade de macacos sem causa definida.

A partir de 2002, o MS iniciou trabalho com equipe interdisciplinar e interinstitucional com técnicos da área de saúde pública de diversas regiões do país, para elaboração do primeiro Manual de Vigilância de Epizootias em PNH, lançado no ano de 2005 (BRASIL, 2005). Lembrando que a Portaria n. 104, de 25 de janeiro de 2011 torna compulsória a notificação de morte de PNH e outras epizootias. Desta forma, a partir desta Portaria, as notificações de epizootias em PNH devem ser realizadas pelos serviços de saúde pública, constituindo grande avanço não só para a vigilância epidemiológica da febre amarela, mas também, de outras zoonoses de interesse envolvidas nestes eventos.

Na região noroeste do Estado do Paraná no período de dezembro de 2000 a maio de 2001, ocorreram relatos de mortes de PNH da espécie *Alouatta caraya* que

só foram notificados em outubro de 2001 à Secretaria Estadual de Saúde do Paraná (SESA-PR). A demora na notificação impossibilitou estabelecer a *causa mortis* dos animais. Ainda em 2001 ocorreram epizootias com mortes de PNH da espécie *Alouatta guariba* no Estado do Rio Grande do Sul, tendo como diagnóstico conclusivo a febre amarela (TORRES *et al.*, 2003). Estes fatos contribuíram para que os técnicos da SESA-PR iniciassem o planejamento de ações que inserissem a vigilância de epizootias em PNH dentro da vigilância epidemiológica da febre amarela. Entre as ações, foi realizada a primeira capacitação de técnicos (médicos veterinários), das 22 Regionais de Saúde do Estado, para a incorporação desta vigilância como ferramenta das investigações e monitoramento de zoonoses de interesse envolvendo estes animais. A proposta da SESA-PR foi estabelecer a vigilância de epizootias em PNH, tanto na forma passiva (preconizada pelo MS) quanto na forma ativa, visando um monitoramento constante de zoonoses de interesse à saúde pública. Além disso, consolidar uma massa crítica de técnicos e pesquisadores colaboradores, da SESA-PR, UEL e UFPR, para execução e aprimoramento deste modelo de vigilância (SVOBODA, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAIS DE ESTUDO

No estado do Paraná os locais de estudo foram: fragmento florestal do Parque Barigui, município de Curitiba; fragmento florestal Complexo Ayrton Senna, município de São José dos Pinhais; fragmento florestal Parque do Superagui, município de Guaraqueçaba (FIGURA 16).

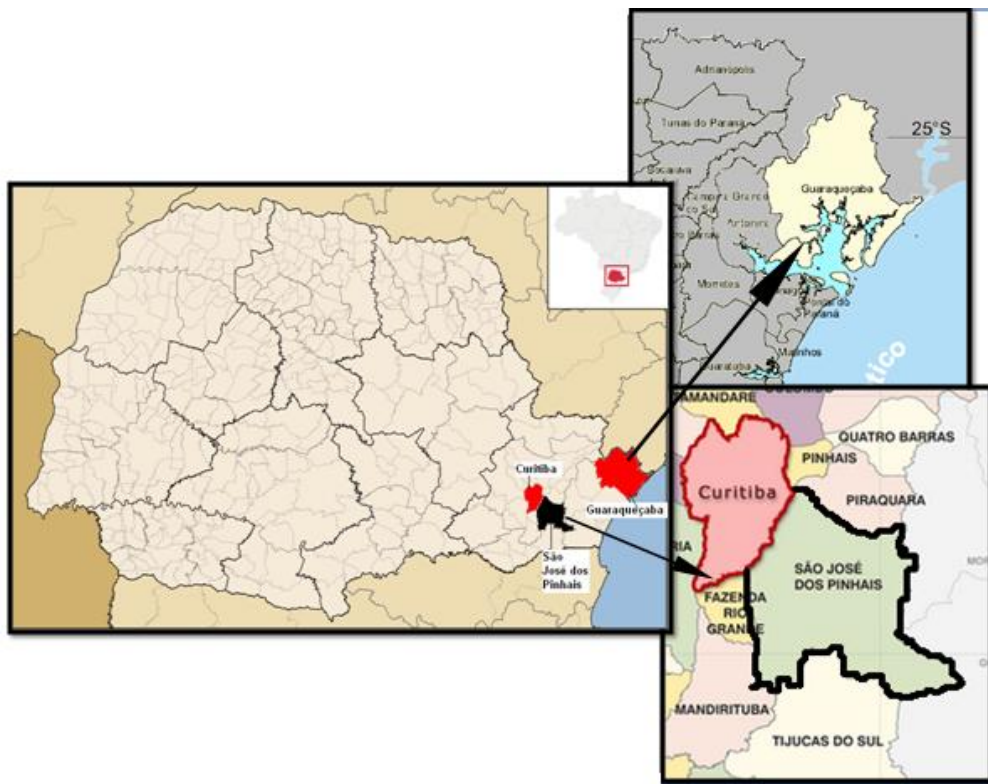


FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO DOS LOCAIS DE ESTUDO NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL
 FONTE: Modificado pelo autor (2011)

No estado de Santa Catarina os locais de estudo foram: Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial (CEPESBI), município de Indaial; e Parque Ecológico do Córrego Grande, município de Florianópolis (FIGURA 17).

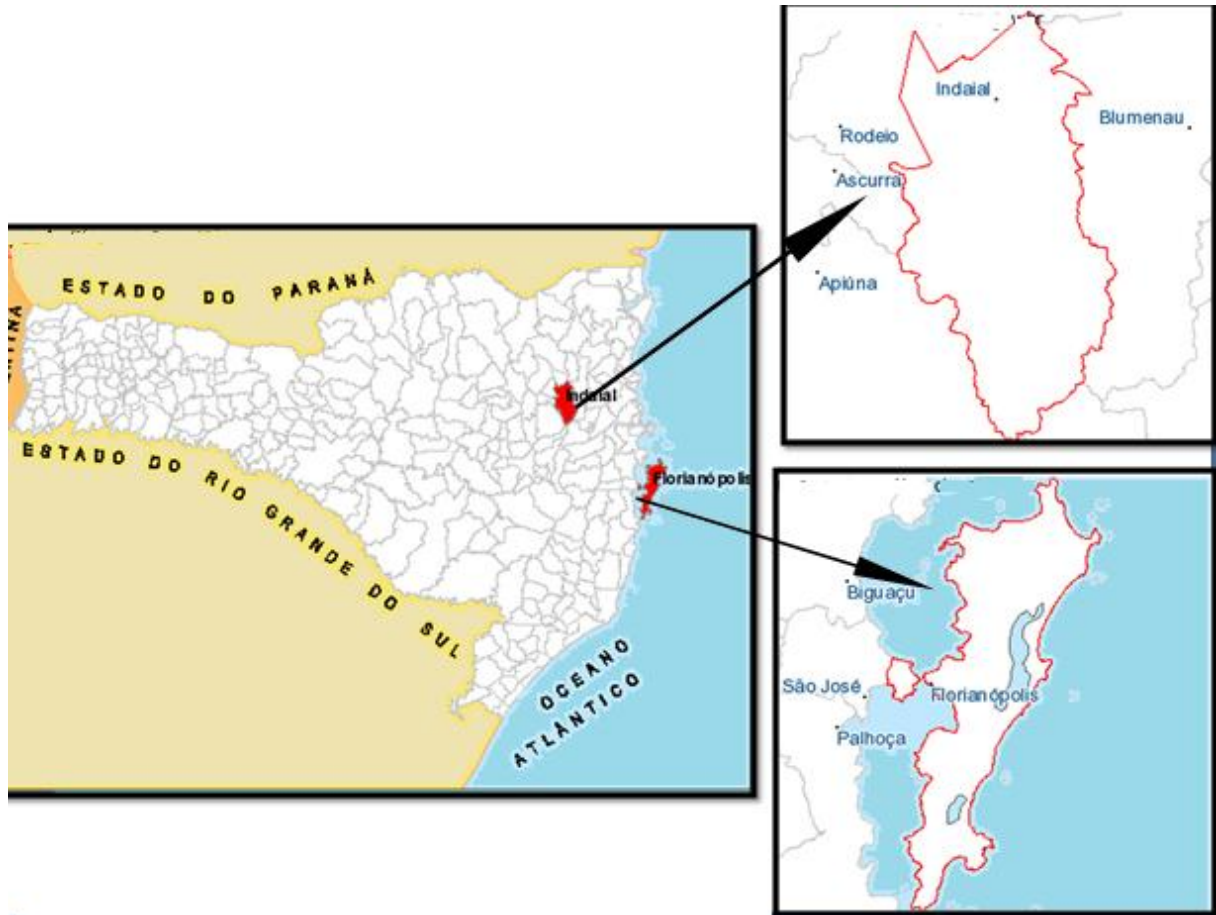


FIGURA 17 - REPRESENTAÇÃO DOS LOCAIS DE ESTUDO EM SANTA CATARINA, BRASIL
 FONTE: Modificado pelo autor (2011)

3.1.1 Fragmento florestal Parque Barigui, Curitiba, Paraná

O Parque Municipal do Barigui, localizado no município de Curitiba, possui área total de 1.400.000 m² e é formado por capões de floresta alterada e mata secundária, está sob a jurisdição da Prefeitura Municipal de Curitiba – Secretaria Municipal do Meio Ambiente. Está localizado em latitude 25° 25' 34.52" S, e longitude 49° 18' 27.03" W. A fauna deste local é composta por garça-branca, quero-quero, tico-tico, sabiá, biguatinga, preá, capivara, cutia, sagüi, dentre outros (FIGURA 18) e gambá. Dentre os exemplares da flora, pode-se citar: araucária, erva-mate, pitangueira, vassourão-branco, bromélia, orquídea, mirta, guabirotuba e guabiroba. O Parque é aberto a visitação pública e estes animais estão em constante contato com os visitantes (CURITIBA, 2011).



FIGURA 18 –EXEMPLAR DE *Callithrix* spp., EVIDENCIADO NA REDE ELÉTRICA PARQUE BARIGUI, CURITIBA, PARANÁ
FONTE: PIOTROVSKI (2011)

3.1.2 Fragmento florestal Complexo Ayrton Senna, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil

O Complexo Ayrton Senna, Renault, localizado no município de São José dos Pinhais, Paraná, na latitude 25°31'21"S, e longitude 49°7'5"W, possui 2,5 milhões m², cerca de 60% são áreas protegidas de florestas, com uma grande diversidade de espécies da flora e fauna brasileiras. Existem residências a 200 m da propriedade e escolas a 2500 m. Através de uma parceria com a Universidade Federal do Paraná (UFPR), o Departamento de Zoologia realizou um levantamento das espécies de aves e mamíferos que vivem nas áreas de mata da Renault do Brasil. Muitas espécies foram identificadas, entre elas tatus, gambás, ouriços, corujas, carcarás, esquilos, jaguatiricas, pica-paus, gralhas azuis, cachorros-do-mato, veados e macacos bugio (RENAULT DO BRASIL, 2011) (FIGURA 19).



FIGURA 19 – EXEMPLAR DE *Alouatta guariba clamitans* NO COMPLEXO AYRTON SENNA, SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PARANÁ
 FONTE: RENAULT DO BRASIL, 2011.

3.1.3 Parque Nacional do Superagui, Guaraqueçaba, Paraná

A área de estudo localizada no Parque Nacional do Superagüi, considerado parte de um dos cinco ecossistemas costeiros mais notáveis do mundo e está localizado no município de Guaraqueçaba, abrangendo a porção mais setentrional do litoral do estado do Paraná, na divisa com o estado de São Paulo, sua localização geográfica é latitude 25°18'24" S, e longitude 48°19'44 W". A ilha do Superagüi, na qual o estudo foi conduzido, é uma ilha artificial, formada após a abertura do canal do Varadouro no ano de 1953. A ilha artificial resultante da abertura do canal tem uma área de 14.511 ha, representando quase metade da extensão do parque. Além do mico-leão de cara-preta (FIGURA 20), ocorrem na ilha *Cebus nigritus*, *Alouatta guariba clamitans* e outros mamíferos como, jaguatirica, paca, onça-parda, cutia e veado. A ocupação humana na ilha atualmente se resume a pequenas comunidades caissaras, dentre as quais a comunidade da Barra do Superagüi é a maior (MORO-RIOS, 2009).



FIGURA 20 – EXEMPLARES DE *Leontopithecus caissara* NO PARQUE DO SUPERAGUI, GUARAQUEÇABA, PARANÁ
FONTE: CELSO MARGRAF, 2010.

3.1.4 Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial (CEPESBI), Indaial, Santa Catarina

O CEPESBI e Observatório de Primatas do Morro Geisler foi criado em março de 1992. Sendo mantido por meio de um convênio entre a Prefeitura Municipal de Indaial e a Fundação Universidade Regional de Blumenau - FURB. Desde sua fundação, o centro tem realizado atividades de pesquisa, educação ambiental e integração da comunidade local com estudantes universitários e pesquisadores. Dentre as principais atividades do centro destaca-se o Projeto Bugio, um estudo científico que procura conservar a subespécie *Alouatta guariba clamitans* Cabrera, 1940 (Primates: Atelidae), o bugio ruivo. O CEPESBI localiza-se no Morro Geisler, latitude 26°53'42"S, e longitude 49°13'34"W, em Indaial, Santa Catarina, uma área de 40 ha. de Floresta Ombrófila localizada no perímetro urbano do

município e que possui ligação com o Parque Nacional da Serra do Itajaí (FURB, 2011). Neste local, os bugios são mantidos em recintos com 3,0 m de largura x 5,0 m de comprimento x 2,6 m de altura, enriquecidos com cordas, troncos e plataformas alimentares. A limpeza e a desinfecção dos recintos são realizadas diariamente e as pessoas envolvidas no manejo utilizavam equipamentos de proteção individual. Alguns destes animais tem origem desconhecida, outros eram de vida livre e ainda outros eram mantidos em cativeiros ilegais e sofriam maus tratos.

3.1.5 Parque Ecológico Córrego Grande, Florianópolis, Santa Catarina

Está localizado na Rua João Pio Duarte Silva, nº. 535, no Bairro Córrego Grande, Florianópolis, Santa Catarina. Possui 21,3 hectares e a localização geográfica é latitude 27°35'58" S, e longitude 48°30'41" W. O Parque está aberto a visitação pública. Localiza-se na área urbana e está próximo à escola e áreas comerciais e residenciais. Entre a fauna existente no Parque existem alguns animais domesticados como galinhas, galos, patos e coelhos, e também outros animais como biguás, garças, araquã, papagaios, tucanos, gralhas, além de pequenos mamíferos como os gambás, um grupo de cerca de 40 sagüis (FIGURA 21), répteis como o jabuti, jacaré do papo amarelo e cágados. Dentre a flora nativa local tem sê alguns exemplares como o pau-brasil, garapuvu, imbaúba, palmitero, araribá amarelo, paineira (FLORIANÓPOLIS, 2011).



FIGURA 21 – EXEMPLAR DE *Callithrix penicillata*, PARQUE DO CÓRREGO GRANDE, FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA
FONTE: GOMES (2011).

3.2 AMOSTRAS

As amostras de fezes dos PNH foram obtidas nas seguintes localidades do Estado do Paraná e Santa Catarina conforme a (TABELA 2).

TABELA 2 - RELAÇÃO DAS AMOSTRAS, LOCAL DE OBTENÇÃO E ESPÉCIES DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS

Nº da amostras	Localidade	Cidade/ Estado	Espécie	Total de Amostras
1 a 12	Fragmento Florestal do Parque Superagui	Guaraqueçaba/ PR	<i>Leontopithecus caissara</i> (Mico-leão-da-cara-preta; Lorrini & Persson, 1990; PRIMATES: Callitrichidae)	12
13 a 27	Fragmento Florestal Parque Barigui	Curitiba/PR	<i>Callithrix</i> spp (Sagüi; (PRIMATES: Callitrichidae)	15
28	Fragmento Florestal Parque Ayrton Senna	São José dos Pinhais/PR	<i>Alouatta guariba clamitans</i> (Bugio-ruivo; Humboldt, 1812; PRIMATES: Atellidae)	1
29 a 46	Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial - CEPESBI	Indaial/SC	<i>Alouatta guariba clamitans</i> (Bugio-ruivo; Humboldt, 1812; PRIMATES: Atellidae)	18
47	Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial - CEPESBI	Indaial/SC	<i>Alouatta caraya</i> (Bugio; Humboldt, 1812; PRIMATES: Atellidae)	1
48 a 62	Parque Ecológico do Córrego Grande	Florianópolis/SC	<i>Callithrix penicillata</i> (Sagüi; É. Geoffrey, 1812; PRIMATES: Callitrichidae)	15
TOTAL	---	---	---	62

FONTE: O autor (2011)

Para a pesquisa de Rotavírus, Norovírus e Sapovírus, foram coletadas 62 amostras de fezes de 5 espécies de PNH (*Callithrix* spp., *Callithrix penicillata*, *Leontopithecus caissara*, *Alouatta guariba clamitans* e *Alouatta caraya*) acondicionadas em coletor universal estéril, transportadas em caixas isotérmicas sob refrigeração e armazenadas a -70°C. As amostras foram coletadas no período de maio de 2010 a março de 2011. As análises foram realizadas no período de outubro de 2010 a junho de 2011. As amostras dos animais foram coletadas imediatamente após os animais defecarem.

Estudos sobre a estimativa da população dos animais estudados não foram encontrados, apesar de minuciosa revisão bibliográfica. Estes tipos de estudos são muito raros devido a necessidade de pessoal especializado, falta de recursos e ainda, o fato do tamanho da população destes animais serem muito flutuantes

(populações de vida livre podem ser acometidas por predadores, doenças e a ação predatória do próprio homem).

Os grupos de animais foram escolhidos em regiões onde houvesse a possibilidade de proximidade com seres humanos.

3.2.1 Descrição das coletas das amostras

As amostras de fezes dos micos-leões-da-cara-preta (*Leontopithecus caissara*) do Parque do Superagui foram obtidas com a Autorização do IBAMA para Atividades com Finalidade Científica nº11058-2/2008. As amostras de fezes de bugio (*Alouatta guariba clamitans*) do Parque Ayrton Senna; dos bugios (*Alouatta guariba clamitans* e *Alouatta caraya*) do CEPESBI e dos saguis (*Callithrix pencilatta*) do Parque Ecológico do Córrego Grande foram obtidas com a Licença Permanente do IBAMA para Coleta de Material Zoológico nº10298-1/2007. Estas amostras foram coletadas e cedidas pela equipe de pesquisadores e pós-graduandos do Laboratório de Biodiversidade, Conservação e Ecologia de Animais Silvestres (LABCEAS) sob responsabilidade do Prof. Dr. Fernando de Camargo Passos, do Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, UFPR. Os PNH destas localidades não foram capturados e as amostras foram obtidas durante pesquisa de observação comportamental destes animais, sendo coletadas e acondicionadas em recipientes adequados, imediatamente após a defecação.

Os saguis (*Callithrix* spp.) do Parque Barigui foram capturados pela equipe de veterinários sob responsabilidade do Prof. Rogério Ribas Lange do Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, UFPR (Autorização do IBAMA para Atividades com Finalidade Científica nº23065-2/2010 e Certificado emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná – EUA/SCA/UFPR nº 015/2010). A captura dos animais foi efetuada por meio de armadilhas/cevas, instaladas em locais isolados da região de bosque do Parque Barigui e mantidas sob observação continuada. Os animais capturados foram transportados para o Hospital Veterinário da UFPR, onde foram mantidos temporariamente em gaiolas metálicas individuais medindo 50cmX50cmX100cm com separação de manejo, comedouro, bebedouro, e abrigo. O

conjunto de gaiolas foi alojado em sala com paredes azulejadas de uso exclusivo. O ambiente é climatizado com aquecimento ambiental mantendo a temperatura entre 21 e 22°C. A iluminação é natural e artificial. As instalações eram higienizadas duas vezes ao dia. Para alimentação dos animais foi usado: frutas diversas e suplementação protéica (queijo tipo “Petit Suisse”, mocotó, ovos de codorna, goma-arábica, proteína bovina e larvas de tenébrio). Os saguis foram então marcados individualmente com microchip, submetidos à biometria e cadastrados em banco de dados. As amostras de fezes para este estudo foram coletadas e acondicionadas em recipientes adequados enquanto os animais estavam no Hospital Veterinário, em média uma semana após a captura.

3.3 INVESTIGAÇÃO DE RV, SAV E NOV EM FEZES NAS ESPÉCIES DE PNH (*CALLITHRIX* SPP., *CALLITHRIX PENICILLATA*, *LEONTOPITHECUS CAISSARA*, *ALOUATTA GUARIBA CLAMITANS* E *ALOUATTA CARAYA*)

As amostras de fezes de PNH foram analisadas no Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, sob a supervisão do Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri.

Numa primeira etapa da RT-PCR, o RNA viral é transcrito em DNA utilizando a enzima transcriptase reversa e o *primer* que serve como molde inicial. Os nucleotídeos servem para continuar a cadeia polipeptídica. A próxima etapa é a amplificação da fita dupla de DNA utilizando a enzima *Taq* DNA polimerase. Esta enzima é ativa em altas temperaturas, e inativa em temperaturas menores. Por sua vez a fita dupla DNA se solta e permite a ligação da enzima *Taq* DNA polimerase em cada uma das fitas formando duas novas fitas duplas e assim sucessivamente.

Semi nested PCR serve para melhorar a especificidade e a eficiência da reação, o segmento genômico é amplificado primeiro de forma abrangente, copiando até mesmo seqüências localizadas fora dela, e utilizando-se este primeiro produto, segue-se à amplificação da real seqüência-alvo. Estas duas etapas podem ser realizadas concomitantemente, ou em duas reações separadamente.

Foram usados controles positivos e negativos para a pesquisa de RV, SaV e

NoV, nas metodologias EGPA, RT-PCR e *semi nested* PCR.

Após a realização das metodologias foram armazenadas contra-provas e o restante das amostras não utilizadas foram descartadas. Tanto estas amostras como o material utilizado para os procedimentos, antes de serem descartados, permaneceram em recipiente contendo hipoclorito de sódio 10% por algumas horas, conforme preconiza a Resolução n. 306 de 07 de dezembro de 2004, por se tratar de Resíduos do grupo A.. A manipulação de brometo de etídeo foi realizada com equipamentos exclusivo bem como em sala exclusiva.. Foram usados os equipamentos de segurança básicos.

Para a pesquisa de RV grupo A (P e G tipos), B e C nas fezes de PNH seguiu-se o fluxograma, conforme está representado na (FIGURA 22).

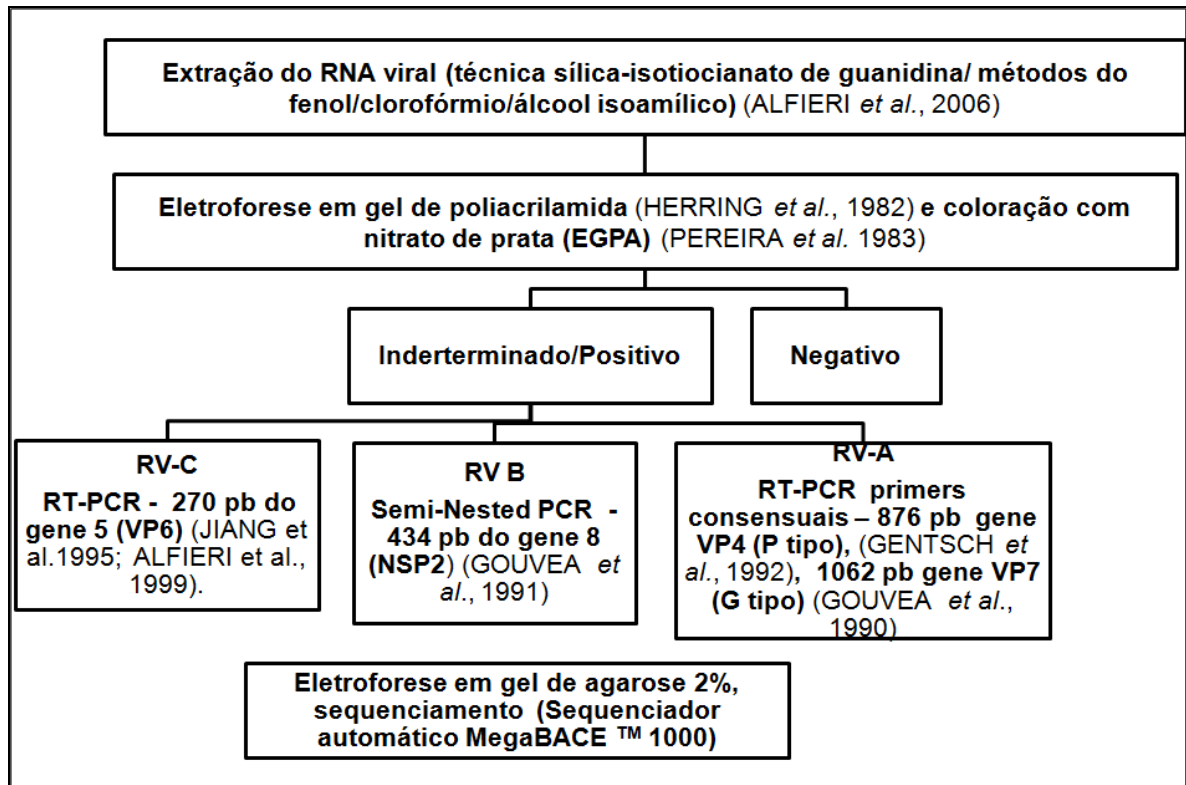


FIGURA 22 - ESQUEMA PARA ANÁLISES DE RV GRUPOS A (P e G TIPOS), B e C
FONTE: O autor (2011)

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) é utilizada para vírus RNA de genoma segmentado (RV possui 11 segmentos genômicos), porém é considerada uma técnica barata e fácil de ser realizada. Esta técnica se baseia na separação dos segmentos genômicos, através da diferença de tamanho molecular destes, em gel de poliacrilamida. A distância de migração de cada segmento de RNA viral na eletroforese é inversamente proporcional ao peso molecular do mesmo. A EGPA permite a análise de variações no genoma viral além de permitir a detecção da ocorrência de infecções mistas (ALFIERI *et al.*, 2007; HERRING *et al.*, 1982). A EGPA porém não permite diferenciar os genótipos, mas a RT-PCR seguida pela Multiplex Nested PCR permite a identificação do genótipo, conforme a amplificação enzimática dos genes das proteínas VP4 (tipos P) e VP7 (tipos G) e com a utilização de iniciadores específicos (GOUVEA *et al.*, 1990; GENTSCH *et al.*, 1992; DAS *et al.*, 1994).

Para a pesquisa de e SaV e NoV nas fezes seguiu-se o fluxograma, conforme está representado na (FIGURA 23).

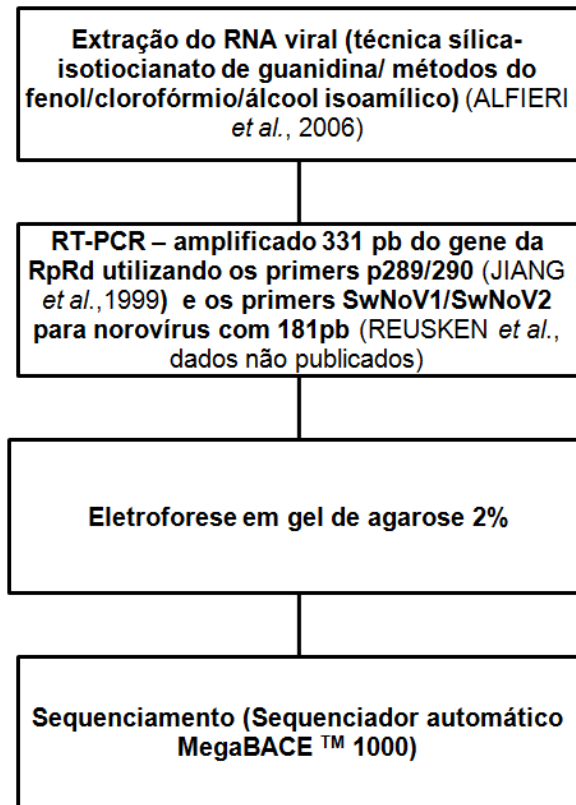


FIGURA 23 - ESQUEMA PARA ANÁLISES DE SaV E NoV
FONTE: O autor (2011)

3.3.1 Extração do RNA viral em amostras de fezes

A extração do RNA foi realizada utilizando suspensões fecais (20% p/v). Para preparar a suspensão fecal realizou-se da seguinte maneira:

- Pesou-se 1 g da amostra de fezes
- Adicionou-se 9 mL de tampão TRIS/Ca²⁺ (Apêndice 2)
- Homogeneizou-se
- Centrifugou-se por 10 min a 10000 x g.
- Recolheu o sobrenadante e estocou a 4°C

Posteriormente, foi utilizada uma associação dos métodos do fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) (SAMBROOK et al., 1989) e da sílica/isotiocianato de guanidina BOOM et al. (1990), descrita por Alfieri et al. (2006).

Realizou-se da seguinte forma:

- Separou-se alíquotas de 500 μL da suspensão fecal em um microtubo
- Adicionou-se 50 μL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%
- Homogeneizou-se em vórtex
- Banho-maria a 56°C durante 15 min
- Homogeneizou-se em vórtex
- Centrifugou-se a 10000 x g durante 30 s
- Adicionou-se 500 μL de fenol / clorofórmio – álcool isoamílico (25:24:21)
- Homogeneizou em vórtex
- Centrifugou-se a 10000 x g durante 10 min
- Recolheu-se o sobrenadante em outro microtubo
- Adicionou-se 500 μL de solução L6 (Apêndice 2)
- Adicionou-se 25 μL de sílica hidratada
- Homogeneizou em vórtex
- Agitou-se durante 30 min a temperatura ambiente
- Centrifugou-se a 10000 x g durante 30 s
- Desprezou-se sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionou-se 500 μL da solução L2 (Apêndice 2)
- Homogeneizou-se em vórtex
- Centrifugou-se a 10000 x g durante 30 s
- Desprezou-se sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Repetiu-se uma vez os quatro últimos passos
- Adicionou-se 1 mL de etanol a 70%
- Homogeneizou em vórtex
- Centrifugou-se a 10000 x g durante 30 s
- Desprezou-se o sobrenadante
- Repetiu-se uma vez os quatro últimos passos
- Adicionou-se 1 ml de acetona PA
- Homogeneizou-se em vórtex
- Centrifugou-se a 10000 x g durante 30 s
- Desprezou-se o sobrenadante
- Secou-se o sedimento em termobloco a 60°C durante 2 min

- Adicionou-se 50 µL de água DEPC
- Homogeneizou-se em vórtex
- Banho-maria a 56°C durante 15 min
- Homogeneizou-se em vórtex
- Centrifugou-se a 10000 x g durante 4 min
- Recolheu-se o sobrenadante em microtubo de 500 µL e estocou a -20°C.

3.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) para análise de RV- A, RV-B e RV-C

Para a realização da EGPA seguiu-se da seguinte forma (HERRING *et al.*,1982):

a) Preparo do Gel de Poliacrilamida:

- Placas de vidro, espaçadores e o pente foram limpos e secos.
- Os espaçadores foram colocados sobre uma placa em posição horizontal, sobrepondo a outra restante.
- Prenderam-se as garras metálicas.
- As extremidades foram vedadas com ágar 2%.
- O conjunto foi colocado em posição vertical, apoiado sobre as garras mantendo em correto nível horizontal no espaço destinado ao gel.
- Adicionou-se o *lower* gel (Apêndice 2) a 7,5% até o nível ligeiramente inferior à extremidade do pente.
- Aguardou-se a polimerização por 30 minutos.
- Adicionou-se o *top* gel (Apêndice 2) 3,5%, o pente é inserido e aguardou-se a polimerização.

b) Corrida Eletroforética:

- As garras foram soltas da parte inferior do conjunto, a vedação e o espaçador foram retirados.
- As placas montadas ao suporte de eletroforese vertical foram fixadas, com o auxílio das garras, evitando a formação de bolhas.

- Os reservatórios foram preenchidos com o tampão de corrida.
- Eliminou-se as bolhas de ar que formaram no conjunto.
- O pente foi cuidadosamente retirado evitando-se danificar as canaletas do gel, com auxílio de uma microseringa.
- Foi usada uma corrente de 20mA e a corrida durou aproximadamente 3 horas, após a passagem da linha do corante aguardou-se 30 minutos.

c) Coloração com Nitrato de Prata

- As placas foram retiradas do suporte.
- Eliminou-se o top gel e foi realizado um pequeno corte na margem inferior esquerda do gel para que possa ter certeza da posição do gel.
- O gel foi deslizado pela placa de vidro com um recipiente apropriado
- Adicionou-se álcool etílico absoluto (30 mL) e ácido acético (1,5 mL) em 300 mL de água bidestilada q,s.p., aguardou-se 30 minutos
- Adicionou-se nitrato de prata 0,55 g em 300 mL de água bidestilada q.s.p. e aguardou-se 30 minutos em agitação suave
- Lavou-se 2 vezes o gel com água bidestilada
- Adicionou-se a solução reveladora
- Adicionou-se ácido acético 5% e permaneceu nesta solução por 15 minutos
- Adicionou etanol 10%
- Visualização foi realizada com auxílio de um transluminador.

3.3.3 Diagnóstico do RV grupo A (P e G tipos)

A pesquisa do RV grupo A foi realizada por meio da técnica RT-PCR com *primers* consensuais para a amplificação de produtos com 876 pb do gene VP4 (genótipo P), de acordo com Gentsch *et al.* (1992), e com 1062 pb do gene VP7 (genótipo G), segundo Gouvea *et al.* (1990). Inicialmente preparou-se o *Mix* de desnaturação para G tipo, *Mix* de desnaturação para P tipo, *Mix* da transcrição reversa (RT), *Mix* da reação em cadeia pela polimerase (PCR) G tipo (VP7) e da PCR P tipo (VP4).

- a) *Mix* de desnaturação para G tipo
- Primer Beg 9 – 5'-GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG-3' (20 pmol): 1 µL (GOUVEA *et al.*, 1990)
 - Primer End 9 – 5'-GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG-3'(20 pmol): 1 µL (GOUVEA *et al.*, 1990)
 - Primer End 9 UK – 5'-GGTCACATCATCAAACCTCTAATCT-3'(20 pmol): 1 µL (GOUVEA *et al.*, 1993)
 - Primer End 9 CRW – 5'-GGTCACTCTTACAGCTTTAACCT-3' (20 pmol): 1 µL (GOUVEA *et al.*, 1993)
 - Água: 1 µL
 - Volume final: 5 µL
- b) *Mix* de desnaturação P tipo
- Primer 4 Con2 – 5'-ATTTCCGGACCATTTATAACC-3' (20 pmol): 1 µL (GENTSCH *et al.*, 1992)
 - Primer 4 Con3 – 5'- TGGCTTCGATCATTTATAGACA-3' (20 pmol): 1 µL (GENTSCH *et al.*, 1992)
 - Água: 3 µL
 - Volume final: 5 µL
- c) *Mix* da transcrição reversa (RT)
- Tampão 10X pH 8,4: 2,5 µL
 - MgCl₂ 50 mM: 2,5 µL
 - dNTP 2,5 mM: 4,0 µL
 - SuperScript HII® 200 U/µL: 0,15 µL
 - Água: 5,85 µL
 - Volume final: 15 µL
- d) *Mix* da reação em cadeia da polimerase (PCR) G tipo (VP7)
- Tampão 10X pH 8,4: 2,5 µL
 - dNTP 2,5 mM: 4,0 µL
 - Platinum® Taq Polymerase 5 U/µL: 0,25 µL
 - Água: 18,25 µL
 - Volume final: 25 µL
- e) *Mix* da reação em cadeia da polimerase (PCR) P tipo (VP4)
- Tampão 10X pH 8,4: 2,5 µL

- dNTP 2,5 mM: 4,0 μ L
- Platinum® Taq Polymerase 5 U/ μ L: 0,25 μ L
- Primer 4 Con2 (20 pmol): 1 μ L
- Primer 4 Con3 (20 pmol): 1 μ L
- Água: 16,25 μ L
- Volume final: 25 μ L

A RT-PCR para RV grupo A seguiu o esquema representado na (FIGURA 24).

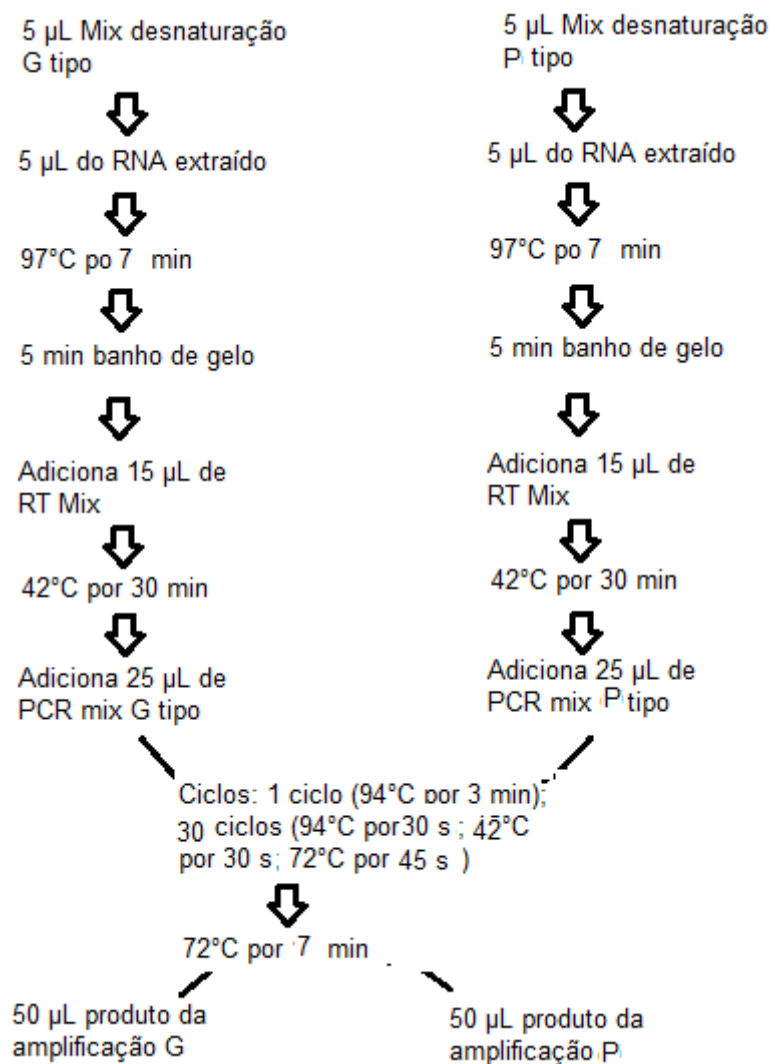


FIGURA 24 - ESQUEMA DA RT-PCR PARA G E P TIPO DE RV GRUPO A

FONTE: Adaptado de GENTSCH *et al.* (1992), GOUVEA *et al.* (1990) GOUVEA *et al.* (1993)

3.3.4 Diagnóstico do RV grupo B

A pesquisa de RV grupo B foi realizada por meio de uma RT-PCR seguida por uma semi-nested PCR para a amplificação de um produto com 434 pb do gene 8 (NSP2) do grupo B (ALFIERI *et al.*, 1999; GOUVEIA *et al.*, 1991). Inicialmente preparou-se o *Mix* de desnaturação, *Mix* da transcrição reversa (RT), *Mix* da reação em cadeia pela polimerase (PCR), *Mix* da desnaturação *semi nested*, *Mix* da *semi nested* PCR.

a) *Mix* de desnaturação

–Primer B 1 5'-CTATTCAGTGTGTCGTGAGAGG-3'(20 pmol): 1 µL
(GOUVEIA *et al.*, 1991)

–Primer B 4 – 5'-CGTGGCTTTGGAAAATTCTTG-3'(20 pmol): 1 µL
(GOUVEIA *et al.*, 1991)

–Água: 3 µL

–Volume final: 5 µL

b) *Mix* da transcrição reversa (RT)

–Tampão 10X pH 8,4: 2,5 µL

–MgCl₂ 50 mM: 2,5 µL

–dNTP 2,5 mM: 4,0 µL

–SuperScript HII® 200 U/µL: 0,15 µL

–Água: 5,85 µL

–Volume final: 15 µL

c) *Mix* da reação em cadeia da polimerase (PCR)

–Tampão 10X pH 8,4: 2,5 µL

–dNTP 2,5 mM: 4,0 µL

–Platinum® Taq Polymerase 5 U/µL: 0,25 µL

–Água: 18,25 µL

–Volume final: 25 µL

d) *Mix* da desnaturação da *semi nested*

–Primer B 1 (20 pmol): 1 µL

–Primer B 3 -5'-CGAAGCGGGCTAGCTTGTCTGC-3'(20 pmol): 1 µL
(GOUVEIA *et al.*, 1991)

–Água: 3 μ L

–Volume final: 5 μ L

e) *Mix da semi nested PCR*

–Tampão 10X: 2,5 μ L

–dNTP 2,5 mM: 4,0 μ L

–MgCl₂ 50 mM: 2,0 μ L

–Platinum® Taq Polymerase 5 U/ μ L: 0,25 μ L

–Água: 11,25 μ L

–Volume final: 20 μ L

Na (FIGURA 25) está representado o esquema da RT-PCR seguida pela eemi Nested PCR.

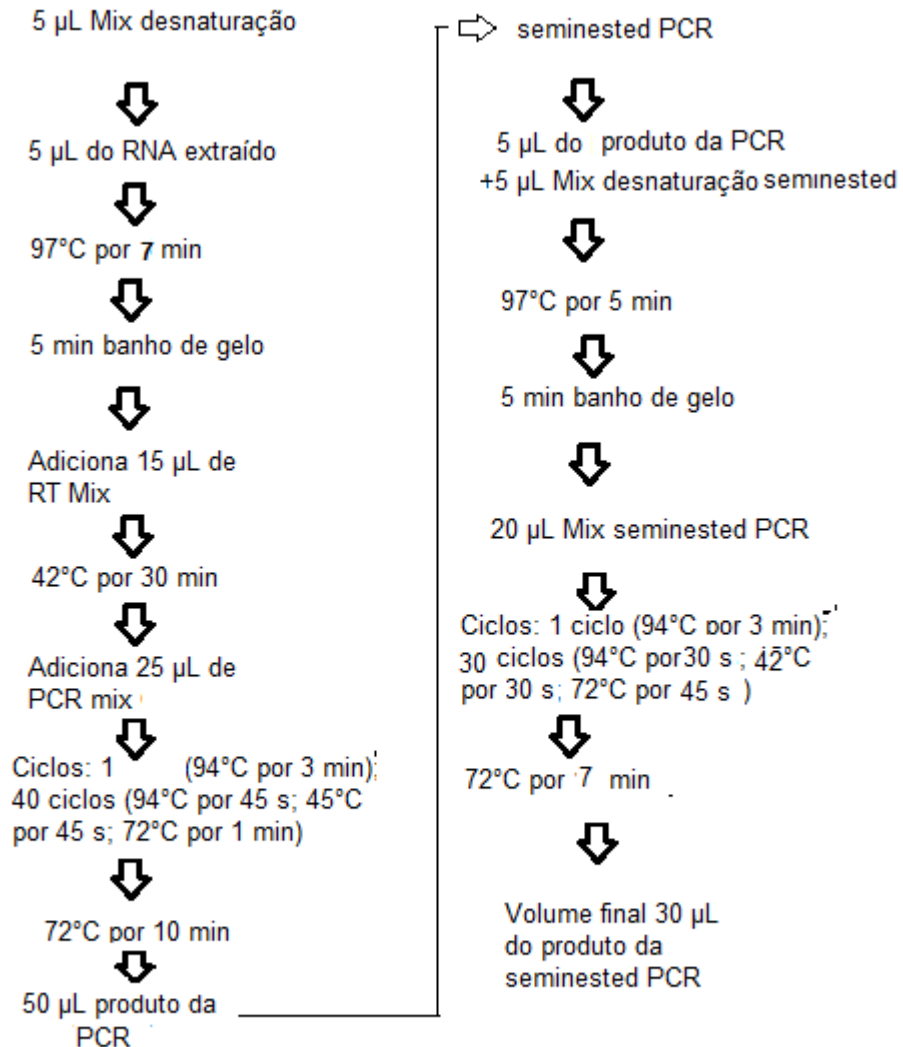


FIGURA 25 - ESQUEMA DE RT-PCR E SEMI NESTED PCR PARA RV GRUPO B
 FONTE: Adaptado de ALFIERI *et al.* (1999), GOUVEA *et al.* (1991)

3.3.5 Diagnóstico do RV grupo C

A pesquisa de RV grupo C foi realizada por meio de uma RT-PCR para a amplificação de um produto com 270 pb do gene 5 (VP6) do RV grupo C, de acordo com Jiang *et al.* (1995), com as modificações descritas por Alfieri *et al.* (1999).

Inicialmente

a) *Mix* de desnaturação

–Primer BMJ 41 – 5'-GGCTTTAAAAATCTCATTCA-3'(20 pmol): 1 μ L

(ALFIERI *et al.*, 1999)

–Primer BMJ 42 – 5'-CCRCTAGTTGATTGAACATA-3'(20 pmol): 1 μ L

(ALFIERI *et al.*, 1999)

–Água: 3 μ L

–Volume final: 5 μ L

b) *Mix* da transcrição reversa (RT-PCR)

–Tampão 10X pH 8,4: 2,5 μ L

–MgCl₂ 50 mM: 2,5 μ L

–dNTP 2,5 mM: 4,0 μ L

–SuperScript HII® 200 U/ μ L: 0,15 μ L

–Água: 5,85 μ L

–Volume final: 15 μ L

c) *Mix* da reação em cadeia da polimerase (PCR)

–Tampão 10X pH 8,4: 2,5 μ L

–dNTP 2,5 mM: 4,0 μ L

–Platinum® Taq Polymerase 5 U/ μ L: 0,25 μ L

–Água: 18,25 μ L

–Volume final: 25 μ L

Na (FIGURA 26) está representado o esquema da RT-PCR para RV grupo C.

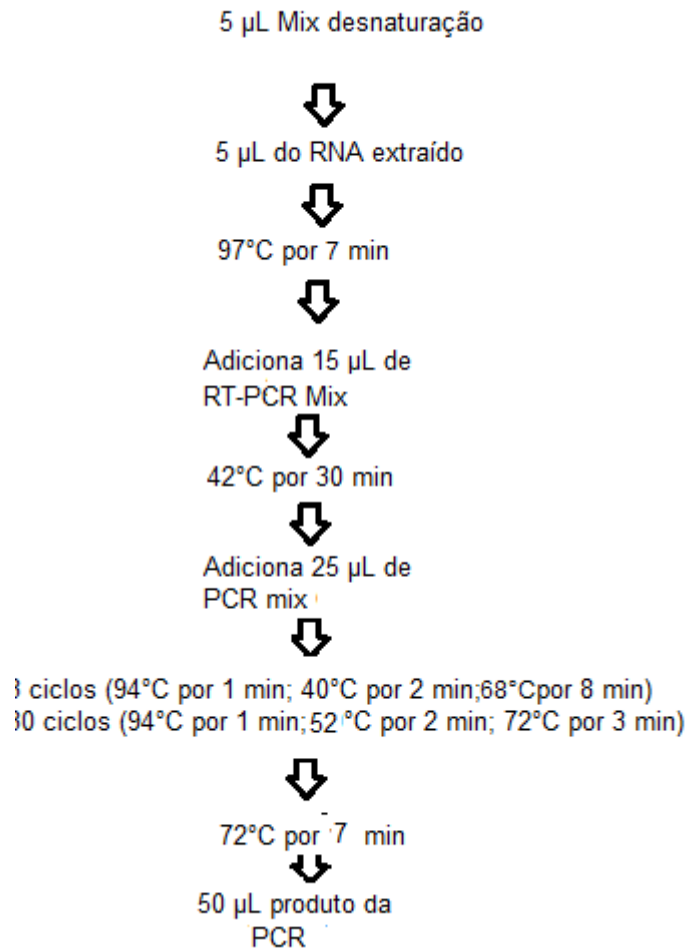


FIGURA 26 - ESQUEMA DA RT-PCR PARA RV GRUPO C
 FONTE: Adaptado de ALFIERI *et al.*(1999); JIANG *et al.* (1995)

3.3.6 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para pesquisa de NoV e SaV

A pesquisa do NoV e SaV nas amostras fecais foi realizada pela técnica da RT-PCR por meio da amplificação de um produto com 319 e 331 pb do gene da RpRd utilizando os *primers* p289/290 descritos por Jiang *et al.* (1999), respectivamente. Inicialmente preparou-se os *Mix* de desnaturação, transcrição reversa (RT) e o *Mix* da reação em cadeia da polimerase (PCR)

a) *Mix* de desnaturação

–Primer p289 - 5 5'- TGACAATGTAATCATCACCATA -3' (20 pmol): 1 µL
(JIANG *et al.*, 1999)

–DMSO: 1 µL

–Água: 3 µL

–Volume final: 5 µL

b) *Mix de RT*

–Tampão 5X [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3); KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM]: 4 µL

–DTT (0,1 M): 2,0 µL

–dNTP (0.1 mM): 1,0 µL

–M-MLV (200 U/µL): 0,5 µL

–Água: 2,5 µL

–Volume final: 10 µL

c) *Mix da PCR*

–Tampão 10X [Tris-HCl 200 mM (pH 8,4); KCl 500 mM]: 7,5 µL

–MgCl₂ 50 mM: 2,0 µL

–dNTP 0,15 mM: 4,0 µL

–p289 – 5'-TGACAATGTAATCATCACCATA-3' (20 pmol): 1,0 µL

–p290 – 5'- GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC-3' (20 pmol): 1,0 µL

– Platinum® *Taq DNA Polymerase* (5 U/µL): 0,5 µL

–Água: 26 µL

–Volume final: 42 µL

Na (FIGURA 27) está representado o esquema da RT-PCR para SaV e NoV

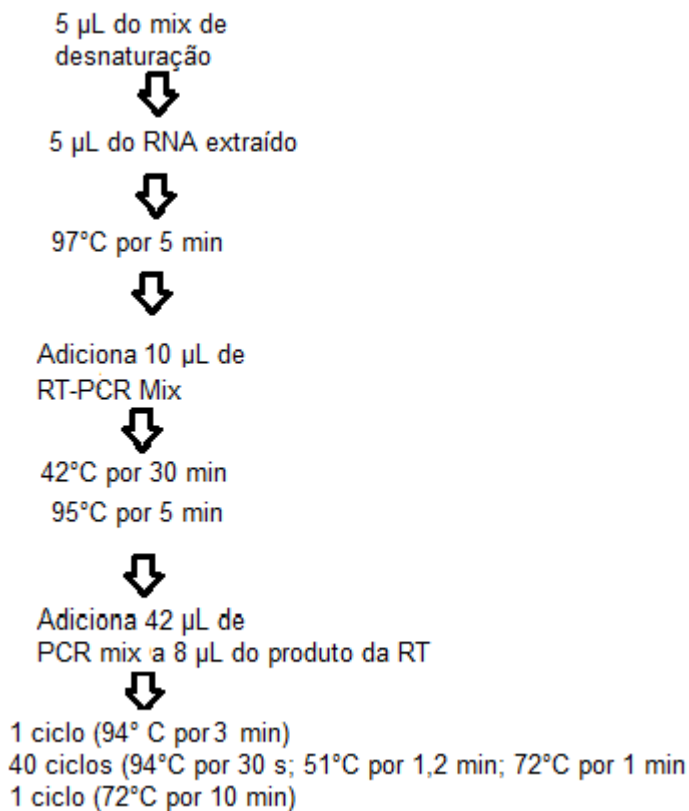


FIGURA 27 - ESQUEMA DA RT-PCR PARA SaV E NoV
 FONTE: Adaptado de JIANG *et al.* (1999)

A identificação do NoV nas amostras fecais também foi realizada pela técnica da RT-PCR por meio da amplificação de um produto com 181 pb do gene que codifica a proteína VP1 do norovírus utilizando os primers SwNoV1/SwNoV2 descritos por REUSKEN *et al.* (dados não publicados). Inicialmente preparou-se os *Mix* de desnaturalização, transcrição reversa (RT) e o *Mix* da reação em cadeia da polimerase (PCR).

a) *Mix* de desnaturalização

- Primer pSwNoV2– 5'- AATCTAACAAAATCTCACCTG -3' (20 pmol): 1 µL
- DMSO: 1 µL
- Volume final: 2 µL

b) *Mix* de RT

- Tampão 5X [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3); KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM]: 4

μL

- DTT (0,1 M): 2,0 μL
- dNTP (0.1 mM): 1,0 μL
- M-MLV (200 U/μL): 0,5 μL
- Água: 0,5 μL
- Volume final: 8 μL

c) *Mix da PCR*

- Tampão 10X [Tris-HCl 200 mM (pH 8,4); KCl 500 mM]: 7,5 μL
- MgCl₂ 50 mM: 2,0 μL
- dNTP 0,15 mM: 4,0 μL
- pSwNoV1 – 5'- CGTACCAGAGGTCAACAAT -3' (20 pmol): 1,0 μL
- pSwNoV2 – 5'- AATCTAACAAAATCTCACCTG -3' (20 pmol): 1,0 μL
- Platinum® *Taq DNA Polymerase* (5 U/μL): 0,5 μL
- Água: 29 μL
- Volume final: 45 μL

Na (FIGURA 28) está representado o esquema da RT-PCR para NoV.

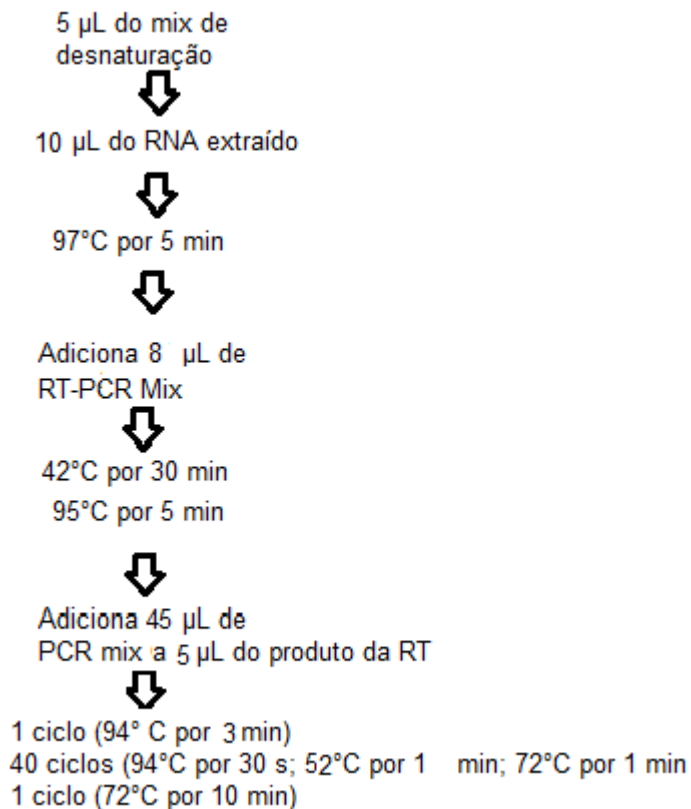


FIGURA 28 - ESQUEMA DA RT-PCR PARA SaV E NoV
 FONTE: Adaptado de REUSKEN *et al.* (dados não publicados).

3.4 ANÁLISE DO PRODUTO DA PCR

Os produtos amplificados na RT-PCR e *semi nested* PCR foram avaliados por meio da eletroforese em gel de agarose a 1,5 ou 2% em solução tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; EDTA 2 mM), sob constante voltagem de 100 volts. O gel foi corado em solução com 0,5 mg/mL de brometo de etídeo e posteriormente visualizado sob luz ultravioleta em transluminador.

Esta técnica tem como fundamento a migração de moléculas de DNA do pólo negativo para o positivo mediante a aplicação de uma diferença de potencial elétrico entre dois pontos. A visualização dos fragmentos amplificados deu-se em virtude da propriedade de incorporação do brometo de etídeo a moléculas de DNA fragmentadas e pela sua capacidade de liberar fluorescência ao ser excitada por raios ultravioletas (UV)

3.5 SEQUENCIAMENTO

Os produtos amplificados pela RT-PCR foram purificados com o GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), quantificados em Qubit™ Fluorometer (Invitrogen Life Technologies, Eugene, OR, USA), e analisados em gel de agarose a 2%. O sequenciamento foi realizado em MegaBACETM 1000/Automated 96 Capillary DNA Sequence, Thermo Sequenase™ II DNA Polymerase e DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), utilizando os primers forward e reverse utilizados na PCR. As sequências e a qualidade das mesmas foram obtidas nos programas CAP3 e Phred, respectivamente (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). As sequências foram analisadas no programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar a similaridade de nucleotídeos das sequências obtidas com sequências que estejam depositadas em bases públicas de dados.

4 RESULTADOS

No período de maio de 2010 a junho de 2011 foram coletadas 62 amostras de fezes de 5 diferentes espécies de PNH (*Callithrix* spp., *Callithrix penicillata*, *Leontopithecus caissara*, *Alouatta guariba clamitans* e *Alouatta caraya*). As amostras de fezes eram de aspecto não diarréico. Entre o período da coleta e a análise laboratorial das amostras, estas foram armazenadas em congelador a -70°C.

As análises laboratoriais realizadas nas amostras de fezes de PNH para pesquisar RV dos grupos A, B e C iniciaram-se com a extração do RNA viral, seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) para detectar RV grupos A, B e C. Nos casos em que os resultados da EGPA foram inconclusivos, realizou-se as seguintes análises laboratoriais: (1) RT-PCR para RV grupo A (P e G tipos); (2) *Semi nested* PCR para RV grupo B; (3) RT-PCR para RV grupo C. O produto amplificado obtido na PCR foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídeo. Nos casos em que os resultados da PCR foram inconclusivos, realizou-se o seqüenciamento do produto amplificado.

No caso da pesquisa de NoV e SaV nas amostras de fezes de PNH usou-se a técnica da RT-PCR. Assim como ocorreu nos procedimentos para a pesquisa de RV grupo A, B e C, produto amplificado obtido na PCR foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídeo. Ainda, foram realizados sequenciamentos nos casos em que os resultados da PCR foram inconclusivos.

4.1 PESQUISA DE RV GRUPOS A, B e C

As manifestações clínicas da infecção por RV não são suficientes para determinar o diagnóstico devido à existência de um grande número de patógenos causadores dos mesmos sintomas e também ao fato da infecção em alguns casos ser assintomática. A técnica diagnóstica usada neste trabalho para a detecção viral permite a caracterização molecular e auxilia nos estudos epidemiológicos (SANTOS; SOARES, 2008).

4.1.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)

Após a extração do RNA viral pelo método de sílica-isotiocianato de guanidina associado ao de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico em amostras de fezes de PNH, foi realizado EGPA em todas as amostras, porém em algumas delas o resultado foi inconclusivo (amostras 28, 34, 43, 47, 49, 50, 53, 54, 62 – TABELA 3), ou seja, não foi possível afirmar que havia RV nestas amostras.

TABELA 3 - RELAÇÃO DAS AMOSTRAS E RESULTADOS OBTIDOS PELOS MÉTODOS EGPA, RT-PCR PARA RV-A E SEMI NESTED PCR PARA RV-B E RV-C, DE 2010 A 2011, LONDRINA-PR, 2010-2011

Amostra	EGPA	RT-PCR RV-A (P e G)	Semi-Nested RT-PCR RV-B	RT-RV-C	Sequenciamento
1 a 27	negativo	NR	NR	NR	NR
28	inconclusivo	negativo	negativo	negativo	NR
28 a 33	negativo	NR	NR	NR	NR
34	inconclusivo	negativo	negativo	negativo	NR
35 a 42	negativo	NR	NR	NR	NR
43	inconclusivo	negativo	negativo	negativo	NR
42 a 46	negativo	NR	NR	NR	NR
47	inconclusivo	negativo	negativo	inconclusivo	negativo
48 e 498	negativo	NR	NR	NR	NR
49	inconclusivo	negativo	negativo	negativo	NR
50	inconclusivo	negativo	negativo	negativo	NR
51 e 52	negativo	NR	NR	NR	NR
53	inconclusivo	negativo	negativo	negativo	NR
54	inconclusivo	negativo	negativo	negativo	NR
55 a 61	negativo	NR	NR	NR	NR
62	inconclusivo	negativo	negativo	negativo	NR

FONTE: O autor (2011)

NOTA: EGPA: Eletroforese em gel de poliacrilamida

RV-A (P e G): Rotavírus Grupo A (genótipos P e G)

RV-B: Rotavírus Grupo B

RV-C: Rotavírus Grupo C

NR: Não realizado

Na (FIGURA 29) pode-se visualizar uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (EGPA) corado com nitrato de prata representativo das amostras negativas.

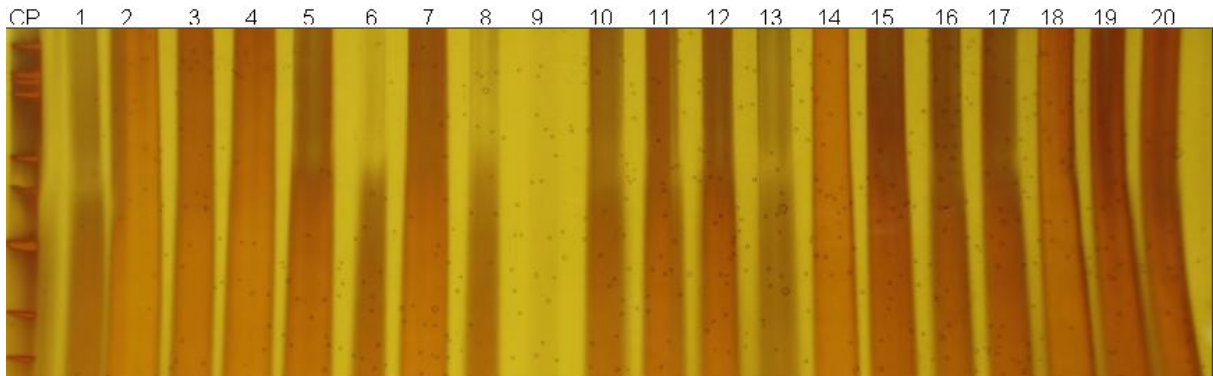


FIGURA 29 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (EGPA) CORADO COM NITRATO DE PRATA APÓS EXTRAÇÃO POR FENOL-CLOROFÓRMIO-ÁLCOOL ISOAMÍLICO E SÍLICA-ISOTIACIANATO DE GUANIDINA EM AMOSTRAS DE FEZES DE PRIMATAS NÃO HUMANOS

FONTE: O autor (2011)

NOTA: CP – controle positivo. Canaletas 1 a 20 (amostras 1 a 20, respectivamente)

Para confirmação das nove amostras inconclusivas no EGPA, foi realizado RT-PCR para RV grupo A (P e G tipos), *Semi nested* PCR para RV grupo B e RT-PCR para RV grupo C

4.1.2 RT-PCR para RV grupo A: P e G tipos

As nove amostras inconclusivas na EGPA foram testadas na RT-PCR para RV grupo A (P e G tipos). Após os produtos amplificados da PCR foram aplicados em gel de agarose e corado com brometo de etídeo. As nove amostras de fezes de PNH que foram inconclusivas na EGPA foram negativas para RV grupo A (P e G tipos). Um gel de agarose representativo das amostras negativas para RV grupo A (P e G tipos) estão representados abaixo (FIGURA 30).

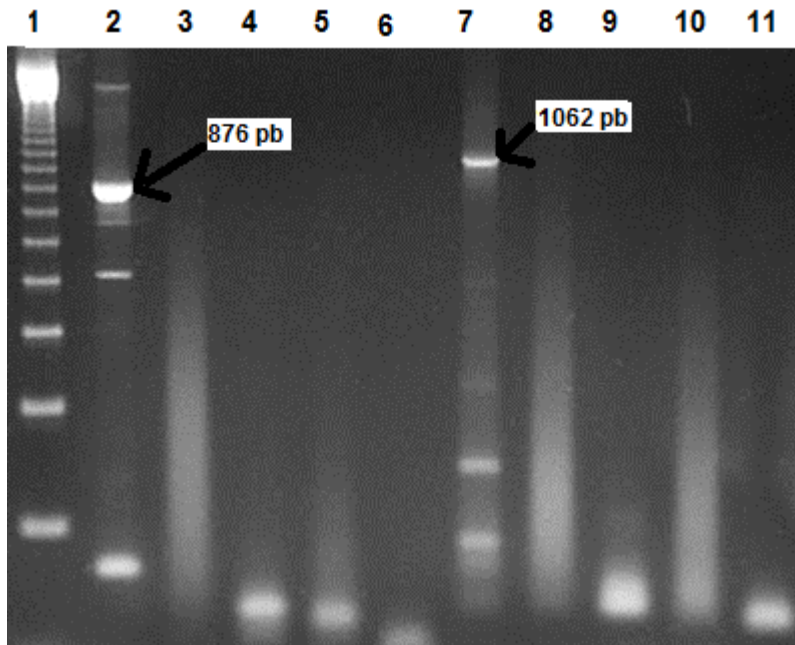


FIGURA 30 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO OS TESTES DE RT-PCR PARA RV GRUPO A, P (876 pb) e G TIPO (1062 pb), DE AMOSTRAS DE FEZES DE PRIMATAS NÃO HUMANOS

FONTE: O autor (2011)

NOTA: linha 1 (padrão), linha 2 (controle positivo P tipo), linhas 3 a 5 (amostras negativas) linha 6 (controle negativo), linha 7 (controle positivo G tipo), linhas 8 a 10 (amostras negativas) linha 11 (controle negativo)

4.1.3 *Semi nested* PCR para RV grupo B

Para confirmação das nove amostras inconclusivas no EGPA foi realizado *Semi-Nested* PCR para RV grupo B. Através do gel em agarose corado com brometo de etídeo pode-se visualizar que as referidas amostras foram negativas para RV grupo B. Um gel de agarose representativo das amostras negativas para RV grupo B estão representados abaixo (FIGURA 31).

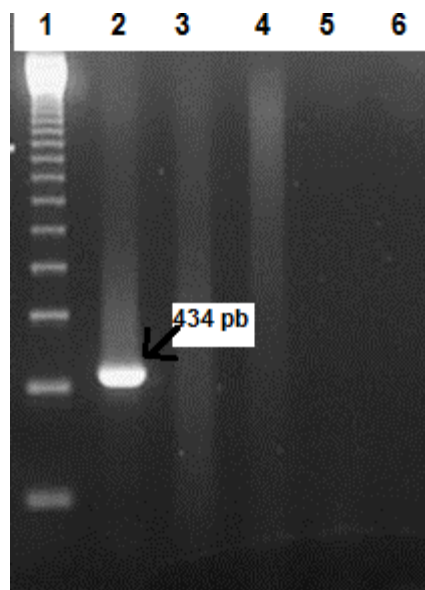


FIGURA 31 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO OS TESTES DE *Semi-Nested* PCR PARA RV GRUPO B (434 pb), DE AMOSTRAS DE FEZES DE PRIMATAS NÃO HUMANOS

FONTE: O autor (2011)

NOTA: 1 (padrão), linha 2 (controle positivo), linhas 3 a 5 (amostras negativas) linha 6 (controle negativo)

4.1.4 RT- PCR para RV grupo C

Foi realizado a RT-PCR para RV grupo C, das mesmas amostras de fezes inconclusivas no EGPA. Através do gel em agarose corado com brometo de etídeo pode-se visualizar que as referidas amostras foram negativas para RV grupo C. Um gel de agarose representativo das amostras negativas para RV grupo C abaixo (FIGURA 32).

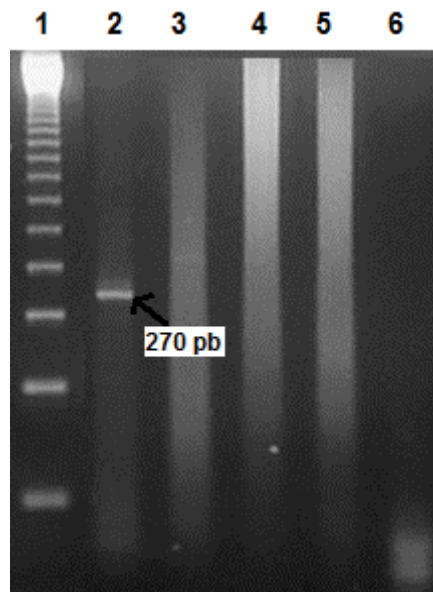


FIGURA 32 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO OS TESTES DE RT-PCR PARA RV GRUPO C (270 pb), DE AMOSTRAS DE FEZES DE PRIMATAS NÃO HUMANOS

FONTE: O autor (2011)

NOTA: 1 (padrão), linha 2 (controle positivo), linhas 3 a 5 (amostras negativas) linha 6 (controle negativo)

4.2 RT-PCR PARA NoV E SaV

Todas as 62 amostras também foram testadas para NoV e SaV. Foi realizada a RT-PCR utilizando o *primer* p289/290 que amplifica tanto o NoV e SaV e os *primers* pSwNoV1e pSwNoV2 que amplificam NoV (TABELA 4).

TABELA 4 - RELAÇÃO DAS AMOSTRAS E RESULTADOS OBTIDOS PELO MÉTODO RT-PCR PARA NoV E SaV, DE 2010 A 2011, LONDRINA-PR, 2010-2011

Amostra	RT-PCR Calicivírus	Sequenciamento
1 e 2	negativo	NR
3	inconclusivo	negativo
4 a 13	negativo	NR
14	inconclusivo	negativo
15 a 27	negativo	NR
28	inconclusivo	NR
29	negativo	NR
30	inconclusivo	NR
31	negativo	NR
32	inconclusivo	NR
33	negativo	NR
34	inconclusivo	NR
35	inconclusivo	NR
36 a 39	negativo	NR
40	inconclusivo	negativo
41 a 43	negativo	NR
44	inconclusivo	NR
45	inconclusivo	negativo
46	negativo	NR
47	inconclusivo	NR
48 a 54	negativo	NR
55	inconclusivo	negativo
55 a 62	negativo	NR

FONTE: O autor (2011)

NOTA: NoV: norovírus

SaV: sapovírus

NR: não realizado

Para visualizar o produto amplificado da RT-PCR foi aplicado o produto desta reação em gel de agarose e após coloração com brometo de etídeo, foi

visualizado o gel em aparelho transluminador. Desta forma foi possível visualizar, em 12 amostras consideradas inconclusivas, bandas com altura próxima à correspondente a 319 pb ou 331 pb.

Dentre as 12 amostras inconclusivas, cinco delas (3, 14, 40, 45 e 55 – TABELA 4) foram selecionadas e seqüenciadas para confirmação, sendo que nenhuma delas correspondeu ao NoV ou SaV.

Um gel de agarose representativo das amostras negativas para NoV E SaV representados abaixo (FIGURA 33).

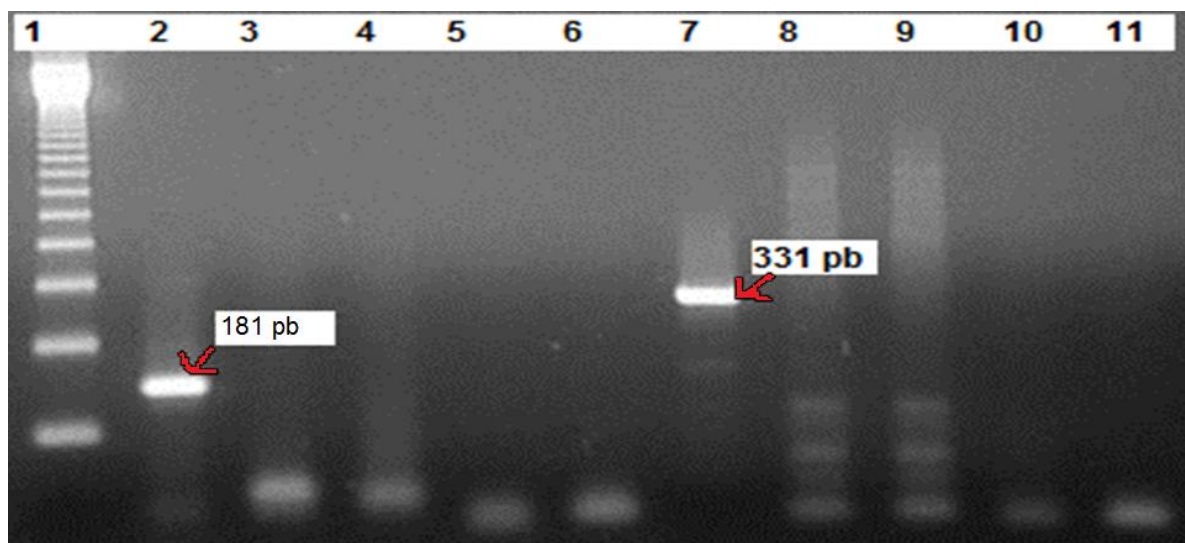


FIGURA 33 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO OS TESTES DE RT-PCR PARA NoV (181 pb) E SaV (331 pb) DE AMOSTRAS DE FEZES DE PRIMATAS NÃO HUMANOS

FONTE: O autor (2011).

NOTA: linha 1 (padrão), linha 2 (controle positivo NoV), linhas 3 a 5 (amostras negativas) linha 6 (controle negativo), linha 7 (controle positivo SaV), linhas 8 a 10 (amostras negativas) linha 11 (controle negativo)

5 DISCUSSÃO

As metodologias diagnósticas empregadas para investigação da presença de rotavírus grupos A, B e C; norovírus e sapovírus em fezes de primatas não humanos foram adequadas para esta finalidade e podem ser incluídas nos serviços de Saúde Pública, contribuindo com a vigilância epidemiológica para a Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas (MDDA). Além disso, os resultados obtidos poderão ser utilizados no planejamento de ações de prevenção (imunizações) e controle das doenças diarréicas virais ocasionadas pelos vírus pesquisados no presente trabalho.

Das 62 amostras analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), 9 delas foram inconclusivas, ou seja, apresentaram bandas fracas mas que não possuíam as características típicas do padrão de migração de amostra positiva para RV. Isso é porque a extração do material genético pela técnica fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e da sílica/isotiocianato de guanidina sílica não específica para genoma viral, assim algum outro material genético poderia ser visualizado na EGPA. A RT-PCR, por ser um teste mais específico, permite a confirmação do resultado. Por isso, as 9 amostras inconclusivas negativaram também, após confirmação por RT-PCR para rotavírus grupo A (P e G tipos), Semi nested PCR para rotavírus grupo B e RT-PCR para rotavírus grupo C.

A investigação de NoV e SaV nas 62 amostras por RT-PCR obteve-se 50 amostras negativas e 12 amostras inconclusivas. Para confirmação dos resultados inconclusivos realizou-se o seqüenciamento com os RT-PCR demonstrando resultados negativos para todas as amostras. No caso da metodologia usada para a pesquisa de NoV e SaV, os *primers* utilizados com 319 e 331 pb do gene da RpRd foram: p289/290 descritos por Jiang *et al.* (1999). Estes permitiram a amplificação de vários segmentos genômicos, proporcionando vários resultados inconclusivos. Por isso foram reliazados sequenciamentos para confirmar o resultado.

Desta forma os resultados aqui obtidos para RV (A, B e C), NoV e SaV em amostras de fezes das espécies de PNH (*Callithrix* spp., *Callithrix penicillata*, *Leontopithecus caissara*, *Alouatta guariba clamitans* e *Alouatta caraya*) no período de estudo não evidenciaram a presença destes vírus. Salienta-se a dificuldade de obtenção de amostras de fezes de PNH de vida livre na natureza e o fato de que as amostras não apresentavam aspecto diarréico.

Por outro lado, segundo Ghosh *et al.* (2010) pelo menos cinco estirpes de RV em PNH foram identificadas: estirpe SA11 em macacos *vervet* (*Chlorocebus aethiops*), a estirpe MMU18006 e MMU17959 de RV em macacos rhesus (*Macaca mulatta*), estirpe YK-1 a partir de RV em macaco *pigtail* (*Macaca nemestrina*), estirpe *tuch* de RV em macacos rhesus (*Macaca mulatta*). A estirpe SA11 é umas das estirpes de RV mais estudadas e a estirpe MMU18006 serviu de base para o desenvolvimento de vacinas usadas em humanos (HOSHINO *et al.*, 2003). No entanto, não há relatos de estirpes de NoV e de SaV isolados em PNH, somente em estudos de soroprevalência.

Nos Estados Unidos, em 2003, foi realizada a pesquisa de soroprevalência em PNH, e foi mostrado que cerca de 80% dos animais tiveram contato com o RV e, anticorpo anti-NoV foi predominante nas três espécies de macacos pesquisadas (*mangabey*, *pigtail*, e rhesus), com mais de 50% soropositivos para os genogrupos GI e GII, e mais de 90% para os chimpanzés testados eram soropositivos para NoV GI (JIANG *et al.*, 2004). Em um estudo realizado em 2003, na China, com fezes diarréicas colhidas de macacos de várias espécies, foi demonstrado que eles tinham cerca de 20% de positividade para a RV (WANG *et al.*, 2004).

A probabilidade de encontrar vírus entéricos nas fezes de PNH é maior quando há sinais/sintomas de diarreia, algo que não ocorreu com os PNH durante o desenvolvimento deste estudo. Este fato pode contribuir para justificar alguns resultados negativos, mas há relatos da presença de RV em animais assintomáticos (MACNEAL *et al.*, 2005).

Dentre as cinco espécies de PNH estudadas, cujas amostras fecais não evidenciaram a presença dos vírus entéricos pesquisados, destaca-se a *Leontopithecus caissara*. Esta espécie está criticamente ameaçada e a circulação de novas estirpes virais poderia ocorrer porque o grupo de animais estudado tinha contato com a população humana local, o que poderia trazer prejuízos para a conservação desses indivíduos. Entre os primatas neotropicais poderiam ser investigados os do gênero *Cebus* (macaco-prego), porque geralmente existem em grande número (bandos maiores) e se encontram dispersos em muitas áreas (principalmente rurais e suburbanas) que permitem contato próximo com seres humanos e animais.

Devido ao fato da maioria dos animais deste trabalho ser de vida livre (n=43), e que estes poderiam entrar em contato com pessoas, os PNH não estavam

oferecendo risco de transmissão de RV (A, B e C), NoV e SaV, para estas pessoas. Isto do ponto de vista sanitário é muito importante, pois especialmente nos parques, os animais entram em contato com constantes visitantes e moradores destas localidades (tanto de modo passivo quanto ativo). Além disso, em alguns dos locais pesquisados observa-se a proximidade de pontos de captação de água para abastecimento público, sugerindo que esses animais silvestres, se não estivessem saudáveis, poderiam disseminar doenças através da água. Isso reforça a importância na continuidade da pesquisa de viroses de interesse em Saúde Pública nesses animais.

Tendo em vista a proximidade entre seres humanos e animais nesses locais pesquisados e também por algumas destas espécies serem exóticas, ou seja, espécies invasoras (como *Callithrix* spp. e *Callithrix penicillata*) (FIGURA 34 e 35) há duas grandes implicações biológicas: (1) muitas espécies de animais selvagens são reservatórios de patógenos que ameaçam a saúde de animais e humanos; (2) doenças infecciosas emergentes de animais selvagens representam uma grande ameaça para a conservação da biodiversidade global. Desta forma, é necessária uma contínua vigilância destas doenças infecciosas emergentes oriundas de animais selvagens.

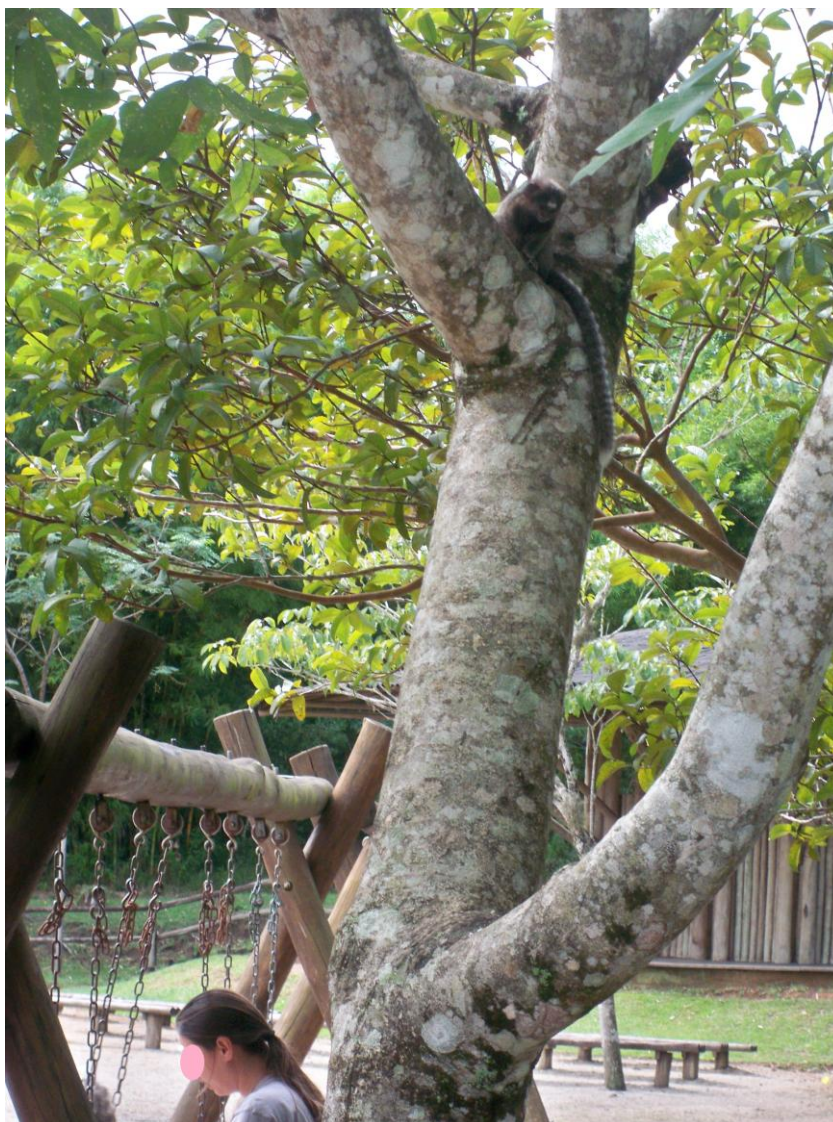


FIGURA 34 – EXEMPLAR DE ESPÉCIE INVASORA (*Callithrix penicillata*) PRÓXIMO A SERES HUMANOS, PARQUE DO CÓRREGO GRANDE, FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA
FONTE: GOMES (2011)



FIGURA 35 – EXEMPLAR DE ESPÉCIE INVASORA (*Callithrix penicillata*) RECEBENDO ALIMENTO DE SERES HUMANOS, PARQUE DO CÓRREGO GRANDE, FLORIANÓPOLIS, SANTA CATARINA
FONTE: GOMES (2011)

É importante ressaltar que cerca de 60% das doenças infecciosas emergentes são zoonoses e destas mais de 70% são originárias de animais de vida livre e a tendência é aumentarem significativamente ao longo do tempo (JONES *et al.*, 2008). A maioria das enfermidades que surgiram ou ressurgiram no mundo que acometem os seres humanos procederam de novos patógenos oriundos de animais ou de produtos de origem animal. Os animais de vida livre (PNH, morcegos, roedores), bem como animais de tração (cavalos) e animais destinados à alimentação (aves, gado) foram implicados no ciclo epidemiológico dessas doenças. Muitos dos agentes responsáveis por novas infecções e doenças nos seres humanos são as viroses (hantaviroses, rotaviroses) (MESLIN, 1997).

Como muitos dos agentes responsáveis por novas infecções e doenças nos seres humanos são os vírus, este estudo poderá contribuir com os serviços de Saúde Pública, especialmente aqueles voltados à prevenção e o controle das gastroenterites virais aqui estudadas

Devido à necessidade de haver uma contínua vigilância destas doenças infecciosas emergentes oriundas de animais selvagens vem sendo criado no Brasil

legislações que aprimorem estas medidas de controle.

No Brasil, segundo a Lei n 8.080, de 19 de setembro 1990, prevê a vigilância epidemiológica com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças e agravos (BRASIL, 1990). Em vista disso, no Brasil, mais especificamente políticas públicas estão sendo criadas visando o controle e a prevenção de doenças ligadas às epizootias (epidemias em animais), como a Portaria n. 104, de 25 de janeiro de 2011 (BRASIL, 2011).

Além disso, o presente trabalho pode contribuir para o estabelecimento do perfil sanitário dos PNH: nas cinco espécies estudadas não estavam circulando RV (grupos A, B e C), NoV e SaV.

As gastroenterites agudas são um problema mundial, pois ocorrem milhões de casos ao ano, tanto em humanos como em animais. Anualmente ocorrem de 138 milhões de casos de diarreia induzidos por RV e, acredita-se que aproximadamente 611.000 crianças morrem por ano devido à infecção por RV (PARASHAR *et al.*, 2006). Além disso, estima-se que os NoV, a cada ano, possam causar cerca de 1,1 milhões de hospitalizações e 218.000 mortes de crianças nos países em desenvolvimento (PATEL *et al.*, 2008). O impacto das sapovirose não foi totalmente estabelecido, mas há descrições de surtos de SaV associados à gastroenterites em lactentes e crianças jovens (GREEN, 2007).

No Brasil em 2006, inclusive nos estados do Paraná e Santa Catarina foi introduzida a Vacina de Rotavírus Humano (VORH) no Calendário Básico de Imunizações para crianças e é dirigida à população de menores de seis meses de idade para proteger antecipadamente as crianças da faixa etária de 6 a 24 meses, nas quais se observa a maior carga de complicações decorrentes da infecção pelo RV (BRASIL, 2005). Além disso, foi criado em 1994 o programa de Monitorização de Doenças Diarreicas Agudas (MDDA), visando à vigilância e medidas de controle para redução dos casos de doenças diarreicas agudas.

Conforme os dados das Vigilâncias Epidemiológicas do Paraná e Santa Catarina, a cobertura vacinal do RV tem sido eficiente nestes estados. Porém ainda há casos de diarreias causados por RV e outros vírus entéricos. Salienta-se novamente que a vacina não é eficaz contra todos os genótipos de RV.

Com os resultados obtidos, neste trabalho, sugere-se que poderiam ser feitas novas investigações com outros indivíduos nestes locais e com um monitoramento constante destes, devido à possibilidade da doença estar em fase

pré-patogênica, sem sinais clínicos ou de detecção viral. Além disso, priorizar a análise de amostras diarréicas, pois são estas que apresentam maior probabilidade da presença de vírus entéricos. É importante ressaltar que após extensiva revisão bibliográfica, não há estudos como este no Brasil, pesquisando vírus causadores de diarreias em fezes de PNH de vida livre.

No presente trabalho, considerando o número total de amostras (n=62, sendo 43 de PNH de vida livre), provenientes de 5 diferentes espécies de PNH deve-se considerar a dificuldade em se obter amostras de fezes de PNH de vida livre (dificuldades em relação à obtenção de Licença Ambiental junto ao órgãos competentes e em relação ao monitoramento in loco). Desta forma, sugerem-se novas investigações em PNH e em períodos diferentes, dando-se preferência para análise de amostras provenientes de fezes diarréicas. E que os serviços de saúde continuem e aprimorem o controle e monitoramento de doenças diarréicas agudas, efetuando a notificação compulsória dos casos aos serviços de saúde e que a cobertura vacinal contra RV seja eficaz.

6 CONCLUSÃO

Com o presente trabalho de investigação da presença de vírus entéricos (rotavírus grupos A, B e C; norovírus e sapovírus) em 62 amostras de fezes de primatas não humanos (*Callithrix* spp., *Callithrix penicillata*, *Leontopithecus caissara*, *Alouatta guariba clamitans* e *Alouatta caraya*) que viviam próximos a populações humanas em algumas localidades do estado do Paraná e Santa Catarina, no período analisado e nas condições experimentais adequadas empregadas, obtiveram-se as seguintes conclusões:

- A pesquisa de rotavírus do grupo A, B e C com a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) detectou 53 amostras negativas e 9 amostras inconclusivas, as quais negativaram também, após confirmação por RT-PCR para rotavírus grupo A (P e G tipos), *Semi nested* PCR para rotavírus grupo B e RT-PCR para rotavírus grupo C.
- A investigação de norovírus e sapovírus nas 62 amostras por RT-PCR obteve-se 50 amostras negativas e 12 amostras inconclusivas. Para confirmação dos resultados inconclusivos realizou-se o seqüenciamento com os RT-PCR demonstrando resultados negativos para todas as amostras.
- Mesmo contando-se com número amostral, relativamente grande, tratando-se da maioria dos animais serem de vida livre (43), os resultados negativos indicaram que não havia circulação dos vírus analisados no período estudado.
- Diante destes resultados, observa-se a necessidade da continuidade dos estudos em busca de novas amostras, no mesmo local com monitoramento constante e em outros locais onde os animais vivam próximo à população, para assim se conhecer o perfil sanitário destes e poder contribuir com os serviços voltados à saúde humana e animal.

REFERÊNCIAS

ABE, M.; ITOA, 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 Research**, v. 144, n.1-2, p. 250-257, Sept. 2009.

AGUIAR, L.M.; LUDWIG, G.; SVOBODA, W.K.; SILVA, L.R.; COLHERA, E.C.; PASSOS, F.C. Ocorrência e georreferenciamento de primatas em ilhas e matas de galeria do Alto Rio Paraná. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE PRIMATOLOGIA, 2005, Porto Alegre. **Anais: Desafios para a conservação em paisagens fragmentadas**. Porto Alegre: FaBioPUCRS, 2005, p. 64-64.

AGUIAR, L.M. Os primatas do corredor do Alto Rio Paraná (Região de Porto Rico, Estados do Paraná e Mato Grosso do Sul): ocorrência, georreferenciamento e parâmetros populacionais. 2006. **Dissertação (Mestrado em Zoologia)** - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

ALFIERI, A.A.; LEITE, J.P.; NAKAGOMI, O.; KAGA, E.; WOODS, P.A.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R. Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence. **Archives of Virology**, v. 141, p. 2353–2364, 1996.

ALFIERI, A. A.; LEITE, J. P., ALFIERI, A. F. Deeteccion of fielf isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide **Journal of Virological Method**, v. 83, n. 1-2, p. 35-43, Dec. 1999.

ALFIERI, A.; ALFIERI, A.; TAKIUCHI, A.; LOBATO Z. I. P. In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2007. p. 773-808.

ALFIERI, A. A.; PARAZZI, M. E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health and Production**, v. 38, n. 7-8, p.521-6, Oct-Nov 2006.

ALTENBURG, B. C.; GRAHAM, D. Y.; ESTES, M. K. Ultrastructural Study of Rotavirus Replication in Cultured Cells. **Journal General of Virology**, Washington, v. 46, n. 1, p. 75-85, Jan. 1980.

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**

Research, v. 102, n. 1, p. 43-51, June 2004.

ARMAH, G. E.; STEELE, A. D.; BINKA, F. N.; ESONA, M. D.; ASMAH, R. H.; ANTO, F.; BROWN, D.; GREEN, J.; CUTTS, F.; HALL, A. Changing patterns of rotavirus genotypes in Ghana: emergence of human rotavirus G9 as a major cause of diarrhea in children. **Journal of Clinical Microbiology**, Spencer Wood, vol. 41, n. 6, p. 2317–2322, June 2003.

ATMAR, R. L.; ESTES, M. K. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. **Clinical Microbiology Review**, v. 14, n. 1, p. 15-37, Jan 2001.
AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**. São Paulo: Terra Brasilis, 1995. 168 p.

ÁVILA-PIRES, F.D. **Princípios de ecologia médica**. Florianópolis: Editora da UFSC. 2000. 328 p.

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

BANK-WOLF, B. R.; KÖNIG, M.; THIEL, H. J. Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 204-12, Jan 2010.

BARMAN, P.; GHOSH, S.; SAMAJDAR, S.; MITRA, U.; DUTTA, P.; BHATTACHARYA, S. K.; KRISHNAN T.; KOBAYASHI N.; NAIK, T. N. RT-PCR based diagnosis revealed importance of human group B rotavirus infection in childhood diarrhea. **Journal of Clinical Virology**, v. 36, n.3, p. 222–227, July 2006.

BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, I. H.; RUCK, B. J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **Lancet**, London, v. 302, n. 7841, p. 1281-1283, Dec. 1973.

BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, I. H.; RUCK, B. J. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. **Lancet**, London, v. 303, n. 7849, p.149-151, Feb. 1974.

BOK, K.; PARRA, G. I.; MITRA, T.; ABENTE, E.; SHAVER, C. K.; BOON, D.; ENGLE, R.; YU, C.; KAPIKIAN, A. Z.; SOSNOVTSEV, S. V.; PURCELL, R. H.; GREEN, K. Y. Chimpanzees as an animal model for human norovirus infection and vaccine development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 108, n. 1., p. 325-30, Jan 2011.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p.495-503, 1990.

BRASIL. Lei n. 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 18055, 20 set. 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde – FUNASA. In: **Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela**. Brasília: MS-FUNASA; 1999.

BRASIL. Portaria n.306, de 07 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde . **Diário oficial [da] República**, Brasília, DF, p. 266, 10 dez. 2004.

BRASIL. Portaria n.518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário oficial [da] República**, Brasília, DF, p. 266, 26 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância de Epizootias em Primatas Não-Humanos**. Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doença diarreica por rotavírus: vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano - VORH - versão preliminar**. Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde Portaria 104, de 25 de janeiro de 2011. Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme o disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelece fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde. In: **Diário Oficial da União**. Secção 1. p 37. n 18.

BRASIL. Ministério da Saúde. Informações de saúde. Indicadores de Mortalidade. **Mortalidade proporcional por doença diarreica aguda em menores de 5 anos de idade, 2006**. Disponível em: < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2008/c06.def> >. Acesso em 20 de ago. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diagnóstico Laboratorial de Rotavírus no Brasil, Ano 2010**. Disponível em: <

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cglab_rotavirus_2010.pdf>. Acesso em 05 de dez. de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Informações de saúde. Indicadores de Mortalidade. **Mortalidade proporcional por doença diarréica aguda em menores de 5 anos de idade.** Disponível em: <
http://200.19.222.8/cgi/tabcgi.exe?Ind_Mortalidade_Menor5/Ind_Mortalidade_Menor5_graf.def >. Acesso em 25 de out. 2011.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Chico Mendes – ICMBIO. Centro de Proteção dos Primatas Brasileiros – CPB. Disponível em: <
<http://www4.icmbio.gov.br/cpb/> >. Acesso em 11 de abril 2011.

BULL, R. A.; HANSMAN, G. S.; CLANCY, L. E.; TANAKA, M. M.; RAWLINSON, W. D.; WHITE, P. A. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, n.7, p.1079-85, Jul 2005.

BUTOT, S.; LE GUYADER, F. S.; KROL, J.; PUTALLAZ, T.; AMOROSO, R.; SÁNCHEZ, G. Evaluation of various real-time RT-PCR assays for the detection and quantitation of human norovirus. **Journal of Virological Methods**, v. 167, n. 1, p. 90-4, Jul 2010.

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION – CDC. **Division of Viral Diseases.** Viral gastroenteritis. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/gastro/faq.htm> >. Acesso em 08 de abril 2011.

CIARLET, M.; ESTES, M. K. Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. **The Journal of General Virology**, v. 80, n. 4. p. 943-928, April 1998.

COCKERILL, F. R. 3RD; SMITH, T. F. Response of the clinical microbiology laboratory to emerging (new) and reemerging infectious diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p.2359-65, Jun. 2004.

COOK, N.; BRIDGER, J.; KENDALL, K. GOMARA, M. I.; EL-ATTAR, L.; GRAY, J. The zoonotic potential of rotavirus. **Journal of Infection**, London, v. 48, n. 4, p.289-302, May 2004.

COOK, S. M.; GLASS, R. I.; LEBARON, C. W.; HO, M. S. Global seasonality of rotavirus infections. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 68, n. 2, p. 171-177, 1990.

CORIA-GALINDO, E.; RANGEL-HUERTA, E.; VERDUGO-RODRIGUEZ, A.; BROUSSET, D.; SALAZAR, S.; PADILLA-NORIEGA, L. Rotavirus infections in galapagos sea lions. **Journal Wildlife Disease**. Lawrence, v. 45, n. 3, p. 722-728, July 2009.

CRAWFORD, S. E.; LABBE, M.; COHEN, J.; BURROUGHS, M. H.; ZHOU, Y.J.; ESTES, M. K. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. **Journal of Virology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 5945-5952, Sept 1994.

CURITIBA. Prefeitura Municipal de Curitiba. Disponível em: <http://www.curitiba.pr.gov.br>. Acesso em 15 de nov. de 2011.

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

DAS, M.S.; DUNN, J.; WOODE, G.N.; GREENBERG, H.B.; RAO, D. Both surface proteins VP4 e VP7 of an asymptomatic neonatal rotavirus strain (1321) have high levels of sequence identity with the homologous proteins of a serotype 10 bovine rotavirus. **Virology**, London, v. 194, n. 1, p. 374-379, May 1993.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 21, n. 287, p. 443-9, Jan 2000.

DÉCTOR, M. A.; ROMERO, P.; LÓPEZ, S.; ARIAS, C. F. Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. **The EMBO Journal**, London, v. 3, n. 12, p. 1175-1080, Dec. 2002.

DESSELBERGER, U. Rotaviruses: basic facts. In: GRAY, J.; DESSELBERGER, U. (Ed.). **Rotaviruses: methods and protocols**. Totowa: Humana Press. 2000. p. 1-9.

DONALDSON, E. F.; LINDESMITH, L. C.; LOBUE, A. D.; BARIC, R. S. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. **Immunological Reviews**. v. 225, p. 190- 211, Oct 2008.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, E. S. (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, v.2, 2001. p. 1747-1785.

ESTES, M. K.; GRAHAM, D. Y.; MASON, B. B. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. **Journal of Virology**, Washington, v. 39, n. 3, p. 879-888, Sept. 1981.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, v.2, 2007. p. 1917-1974.

FANKHAUSER, R. L.; MONROE, S. S.; NOEL, J. S.; HUMPHREY, C. D.; BRESEE, J. S.; PARASHAR, U. D.; ANDO, T.; GLASS, R.I. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States.. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 1, p. 1-7, Jul. 2002.

FARKAS, T.; ZHONG, W. M.; JING, Y.; HUANG, P. W.; ESPINOSA, S. M.; MARTINEZ, N.; MORROW, A. L.; RUIZ-PALACIOS, G. M.; PICKERING, L. K.; JIANG, X. Genetic diversity among sapoviruses. **Archives of virology**. v. 149, n. 7, p. 1309-23, Jul 2004.

FARKAS; T.; NAKAJIMA, S.; SUGIEDA, M.; DENG, X.; ZHONG, W.; JIANG, X. Seroprevalence of noroviruses in swine. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 657-61, Feb 2005.

FLORIANÓPOLIS. Prefeitura Municipal de Florianópolis. Disponível em: <<http://www.pmf.sc.gov.br/>>. Acesso em 18 de nov de 2011.

FURB. Universidade Regional de Blumenau. Projeto Bugio. Disponível em: <<http://www.furb.br/especiais/interna.php?secao=878>>. Acesso em 17 de nov 2011.

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

GENTSCH, J.; WOODS, P.; 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. **Journal Infectious Diseases**, v. 174, :S30- S36, 1996.

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. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago v. 192, n. 1, p. 146-159, Sept. 2005.

GOLANTSOVA, N. E.; GORBUNOVA, E. E.; MACKOW, E. R. Discrete domains within the rotavirus VP5 direct peripheral membrane association and membrane permeability. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, n. 4, p. 2037-2044, Feb. 2004.

GHOSH, S.; GATHERU, Z.; NYANGAO, J.; ADACHI, N.; URUSHIBARA, N.; KOBAYASHI, N. Full genomic analysis of a simian SA11-like G3P[2] rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant: identification of novel VP1, VP6 and NSP4 genotypes. **Infection, Genetics and Evolution**, Montpellier v. 11, n. 1, p. 57-63, Oct 2010.

GOUVEA V, GLASS RI, WOODS P, TANIGUCHI K, CLARK HF, FORRESTER B, FANG Z-Y: Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 276-282, 1990.

GOUVEA, V.; ALLEN, J. R.; GLASS, R. I.; FANG, Z. Y.; BREMONT, M. ; COHEN, J.; MCCRAE, M. A.; SAIF, L. J.; SINARACHATANANT, P.; CAUL, E. O. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n.3, p. 519-523, March 1991.

GOUVEA, V.; RAMIREZ, C.; LI, B.; SANTOS, N.; SAIF, L.; CLARK, H.F.; HOSHINO, Y. Restriction endonuclease analysis of the VP7 genes of human and animal rotaviruses. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n.4, p. 917-923, April 1993.

GOMES, E. C. Saguis. 2011. 1 fotografia, color

GRAHAM, K. L.; HALASZ, P.; TAN, Y.; HEWISH, M. J.; TAKADA, Y.; MACKOW, E. R.; ROBINSON, M. K.; COULSON, B. S. Integrin-using rotaviruses bind $\alpha 2\beta 1$ integrin $\alpha 2$ I domain via VP4 DGE sequence and recognize $\alpha X\beta 2$ and $\alpha V\beta 3$ by using VP7 during cell entry. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, n. 18, p. 9969-9978, Sept. 2003.

GRAY, J. J.; GREEN, J.; CUNLIFFE, C.; GALLIMORE, C.; LEE, J. V.; NEAL, K.; BROWN, D. W. Mixed genogroup SRSaV infections among a party of canoeists exposed to contaminated recreational water. **Journal of Medical Virology**, v. 52, n. 4, p.425-9, Aug 1997.

GREEN KY. In: Knipe DM, Howley PM. (Eds). *Fields Virology*. Philadelphia:

Lippincott Williams & Wilkins Publishers, v.2, 2007. p. 949-979.

GUO, M.; EVERMANN, J. F.; SAIF, L. J. Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink. **Archives Virology**, v. 146, n. 3, p. 479-93, 2001;

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

HERRING, A. J., *et al.* Rapid diagnosis infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington. 16:473-477, 1982.

HOSHINO, Y.; SAIF, L. J.; KANG, S. Y.; SERENO, M. M.; CHEN, W. K.; KAPIKIAN, A. Z. Identification of group A rotavirus genes associated with virulence of a porcine rotavirus and host range restriction of a human rotavirus in the gnotobiotic piglet model. **Virology**, v. 209, n. 1, p. 274-280, May 1995.

HOSHINO, Y.; HONMA, S.; JONES, R. W.; SANTOS, N.; NAKAGOMI O.; NAKAGOMI T.; KAPIKIAN A. Z.; THOULESS, M. E. A rotavirus strain isolated from pig-tailed macaque (*Macaca nemestrina*) with diarrhea bears a P6[1]:G8 specificity. **Virology**, v. 345, n. 1, p. 1– 12, Feb. 2006.

IMAI, M.; AKATANI, K.; IKEGAMI, N.; FURUICHI, Y. Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. **Journal of Virology**, Washington, v. 47, n. 1, p. 125-136, July 1983.

INOUE, S.; YAMASHITA, K.; YAMADERA, S.; YOSHIKAWA, M.; KATO, N.; OKABE, N. Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 181, suppl. 2, p. S270-4, May 2000.

International Union for Conservation of Nature - IUCN. **Who Are the Primates?** Disponível em: <<http://www.primates-ug.org/extent.htm>>. Acesso em 12 de abr. 2011.

ISA, P.; ARIAS, C.F.; LOPEZ, S. Role of sialic acids in rotavirus infection. **Glycoconjugate Journal**, v. 23, n. 1-2, p. 27–37, Feb. 2006.

JIANG BM, DENNEHY PH, SPANGERBERGER S, GENTSCH JR, GLASS RI: First

detection of group C rotavirus in fecal specimens of children with diarrhea in the United States. **Journal Infectious Diseases**, v. 172, p. 45-5, 1995.

JIANG, X.; HUANG, P. W.; ZHONG, W. M.; FARKAS, T.; CUBITT, D. W.; MATSON, D. O. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. **Journal of Virology Methods**, v. 83, n. 1-2, p. 145-54, Dec 1999.

JIANG, X.; WILTON, N.; ZHONG, W. M.; FARKAS, T.; HUANG, P.W.; BARRETT, E.; GUERRERO, M.; RUIZ-PALACIOS, G.; GREEN, K. Y.; GREEN, J.; HALE, A. D.; ESTES, M. K.; PICKERING, L. K.; MATSON, D. O. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, suppl. 2, p. 249-359, May 2000.

JIANG, B.; MCCLURE, H. M.; FANKHAUSER, R. L.; MONROE, S. S.; GLASS, R. I. Prevalence of rotavirus and norovirus antibodies in non-human primates. **Journal of Medical Primatology**, v. 33, n. 1, p. 30-33, Feb 2004.

JONES, K. E.; PATEL, N. G.; LEVY, M. A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J. L.; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990-993, Feb. 2008.

KAHN, L.H. Confronting zoonoses, linking human and veterinary medicine. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 556-561, April 2006.

KALJOT, K. T.; SHAW, R. D.; RUBIN, D. H.; GREENBERG, H. B. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. **Journal of Virology**, Washington, v. 62, n. 4, p. 1136-1144, April 1988.

KAPIKIAN, A. Z.; WYATT, R. G.; DOLIN, R.; THORNHILL, T. S.; KALICA, A. R.; CHANOCK, R. M. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **Journal of Virology**, Washington, v. 10, n. 5, p. 1075-81, Nov 1972.

KAPIKIAN, A. Z. A rotavirus vaccine for prevention of severe diarrhea of infants and young children: development, utilization and withdrawal. In: CHADWIK, D.; GOODE, J. A. (Ed.). **Gastroenteritis viruses**. Chichester: Wiley, 2001. p.153-155.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, E. S. (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins

Publishers, v.2, 2001. p.1787-1833.

KAPLAN, J. E.; GARY, G. W.; BARON, R. C.; SINGH, N.; SCHONBERGER, L. B.; FELDMAN, R.; GREENBERG, H. B. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. **Annals of Internal Medicine**. v. 96, n. 6, p. 756-61, Jun 1982.

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

LODDER, W. J.; VINJÉ, J.; VAN DE HEIDE, R.; DE RODA HUSMAN, A. M.; LEENEN, E. J.; KOOPMANS, M. P. Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in sewage. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, n.12, p. 5624-7, Dec 1999.

LOPMAN, B. A.; REACHER, M. H.; VAN DUIJNHOFEN, Y.; HANON, F. X.; BROWN, D.; KOOPMANS, M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. **Emerging Infectious Diseases**. v. 9, n. 1, p. 90-96, Jan 2003.

LOPMAN, B. A.; REACHER, M.; GALLIMORE, C.; ADAK, G. K.; GRAY, J. J.; BROWN, D. W. A summertime peak of "winter vomiting disease": surveillance of noroviruses in England and Wales, 1995 to 2002. **BMC Public Health**, v. 24, n. 3, p. 13, Mar 2003.

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

LUNDGREN, O.; PEREGRIN, A. T.; PERSSON, K.; KORDASTI, S.; UHNOO, I.; SVENSSON, L. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. **Science**, v. 287, n. 5452, p. 491-495, Jan. 2000.

MCNEAL, M. M.; SESTAK, K.; CHOI, A. H. C.; BASU, M.; COLE, M. J.; AYE, P. P.; BOHM, R. P.; WARD, R. L. Development of a rotavirus-shedding model in rhesus macaques, using a homologous wild-type rotavirus of a new P genotype. **Journal of Virology**, v. 79, n.2, p.944-954, Jan. 2005.

MARGRAFF, C. Mico-leão-da-cara-preta. 2011. 1 fotografia, color

MARKS, P. J.; VIPOND, I. B.; REGAN, F. M.; WEDGWOOD, K.; FEY, R. E.; CAUL, E. O. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission.

Epidemiology and Infection. v. 131, n. 1, p.727-36, Aug 2003.

MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; MATTHIJNSSENS, J.; BUONAVOGLIA, C., CIARLET, M. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 246-255, Jan. 2010.

MATHIEU, M.; PETITPAS, I.; NAVAZA, J.; LEPAULT, J.; KOHL, E.; POTHIER, P.; PRASAD, B. V. V.; COHEN, J.; REY, F. A. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the *vírión*. **The EMBO Journal**, London, v. 20, n. 7, p. 1485-1497, April 2001.

MATTNER, F.; SOHR, D.; HEIM, A.; GASTMEIER, P.; VENNEMA, H.; KOOPMANS, M. Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 69-74, Jan 2006.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**. v. 5, n 5, p. 607-25, Sep-Oct 1999.

McNEAL, M .M.; SESTAK, K.; CHOI, A. H. C.; BASU, M.; COLE, M. J.; AYE, P. P.; BOHM, R. P.; WARD1, R. L. Development of a rotavirus-shedding model in rhesus macaques, using a homologous wild-type rotavirus of a new P genotype. **Journal of Virology**, v. 79, n. 2, p. 944–954, Jan. 2005.

MESLIN, F. X. Global aspects of emerging and potential zoonoses: A WHO Perspective. **Emerging Infectious Diseases**, Geneva: v. 3, n. 2, p. 223-228, April-June 1997.

MERTENS, P. P. C.; ATTOUI, H.; BAMFORD, D. H. The RNAs and Proteins of dsRNA Viruses. **dsRNA viruses**. Disponível em: < http://www.reoviridae.org/dsrna_virus_proteins//rotavirus%20figure.htm >. Acesso em 10 de ago. 2010.

MIDTHUN, K. T.; VALDESUSO, J.; KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y.; GREEN, K. Y. Identification of serotype 9 human rotavirus by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies. **Journal Clinical of Microbiology**, Spencer Wood, v. 27, n. 9, p. 2112-2114, Sept. 1989.

MORO-RIOS, R. F. Comportamento social do mico-leão de cara-preta, *Leontopithecus caissara* Lorini & Persson 1990, no Parque Nacional do Superagüi,

Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná, 2009.

MURPHY, F. A. Emerging zoonoses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n; 3, p. 429-35, Jul-Sep 1998.

NAKATA, S.; ESTES, M. K.; GRAHAM, D.Y.; WANG, S.; GARY, W.; MELNICK, J. L. Detection of antibody to group b adult diarrhea rotaviruses in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, Spencer Wood, v. 25, n. 5, p. 812-818, May 1987.

NILSSON, M.; HEDLUND, K. O.; THORHAGEN, M.; LARSON, G.; JOHANSEN, K.; EKSPONG, A.; SVENSSON, L. Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. **Journal of Virology**, v. 77, n. 24, p. 13117-24, Dec 2003.

OMS – Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <[HTTP://www.who.int/](http://www.who.int/)>. Acesso em 15 de nov. de 2011.

OTSYULA, M.; YEE, J.; SULEMAN, M.; TARARA, R.; MARTIN, J.; WOODS, P.; GLASS, R.; JENNINGS, M. Rotavirus infection in African non-human primates. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 90, n. 6, p. 659-661, 1996.

PANG, X. L.; JOENSUU, J.; VESIKARI, T. Human calicivirus-associated sporadic gastroenteritis in Finnish children less than two years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 18, n; 5, p. 420-6, May 1999.

PANG, X. L.; HONMA, S.; NAKATA, S.; VESIKARI, T. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 181, Supl 2, p.S288-94, May 2000.

PARANÁ. Secretaria do Estado da Saúde. Superintendência de Vigilância em Saúde. **Informe epidemiológico do CIEVS - PARANÁ - Eventos - Semana Epidemiológica 41**. Disponível em: < <http://www.sesa.pr.gov.br> >. Acesso em 25 de out. 2011.

PARASHAR, U.D.; BRESEE, J.S; GENTSCH, J.R.; GLASS, R.I. Rotavirus – Synopses. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, n. 4, p.562-570, Oct./Dec. 1998.

PARASHAR, U.D.; GIBSON, C.J.; BRESEE, J.S.; GLASS, R.I. Rotavirus and severe childhood diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, n. 2, p. 304-306, Feb. 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. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 5, p. 565-571, May 2003.

PASSOS, F. C.; MIRANDA, J. M. D., AGUIAR, L. de M. LUDWIG, G; BERNARDI, I. P., MORO-RIOS, R. F. Distribuição de Primatas no Estado do Paraná, Brasil. In: MARQUES, J. C. (Ed.). **A Primatologia no Brasil**. 10 ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Primatologia, 2007, p. 119-149.

PATEL, M. M.; WIDDOWSON, M. A.; GLASS, R. I.; AKAZAWA, K.; VINJÉ, J.; PARASHAR, U. D. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*. v. 14, n. 8, p. 1224-31, Aug 2008.

PATTON, J. T.; JONES, M. T.; KALBACH, A. N.; HE, Y. H.; XIAOBO, J. Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. **Journal of Virology**, Washington, v. 71, n. 12, p. 9618-9626, Dec. 1997.

PATTON, J. T.; SPENCER, E. Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. **Virology**, v. 277, n. 2, p. 217-225, Nov. 2000.

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

PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S; LEITE, J.P; CANDEIAS, J.A.N.; RACZ, M.L.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; TRABULSI, J.R. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Belem, Brazil **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 90, p. 117-125, 1983

PETRIC, M.; MIDDLETON, P. J.; RAPLEY, W.A.; MEHREN, K.G.; GRANT, C.; 1981. A survey of zoo mammals for antibody to rotavirus. **Canadian journal of comparative medicine**. Gardenvale, v. 45, n. 8, p. 327-329, July 1981.

PIOTROWSKI, C. Saguis. 2011. 1 fotografia, color.

PORUCHYNSKY, M. S.; ATKINSON, P. H. Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. **Journal of Virology**, Washington, v. 65, n. 9, p. 4720-4727, Sept. 1991.

PRASAD, B. V. V.; ESTES, M. K. Electron cryomicroscopy and computer image processing techniques: use in structure–function studies of rotavirus. In: GRAY, J.; DESSELBERGER, U. (Ed.). **Rotaviruses: methods and protocols**. Totowa: Humana Press. 2000. p. 9-32.

RAMIG, R. F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **Journal of Virology**, v. 78, n. 19, p. 10213-10220, Oct. 2004.

RENAULT DO BRASIL. Disponível em: < <http://www.renault.com.br/>>. Acesso em 15 de nov. de 2011.

ROCKX, B. H.; DE WIT, M.; VENNEMA, H.; VINJÉ, J.; DE BRUIN, E.; VAN DUYNHOVEN, Y.; KOOPMANS, M. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. **Clinical Infectious Diseases**. v. 35, n. 3, p. 246-53, Aug 2002.

ROCKX, B. H.; BOGERS, W. M.; HEENEY, J. L.; VAN AMERONGEN, G.; KOOPMANS, M. P. Experimental norovirus infections in non-human primates. **Journal of Medical Virology**. v. 75, n. 2, p. 313-20, Feb 2005.

RUIZ, M. C.; ALONSO-TORRE, S. R.; CHARPILLENNE, A. N.; VASSEUR, M.; MICHELANGELI, F.; COHEN, J.; ALVARADO, F. Rotavirus interaction with isolated membrane vesicles. **Journal of Virology**, Washington, v. 68, n. 6, p. 4009-4016, June 1994.

RICHARDSON, S.; GRIMWOOD, K.; GORRELL, R.; PALOMBO, E.; BARNES, G.; BISHOP, R. Extended excretion of rotavirus after severe diarrhoea in young children. **Lancet**, v. 351, n. 9119, p. 1844-1848, June 1998.

RUIZ, M. C.; COHEN, J.; MICHELANGELI, F. Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infectious. **Cell calcium**, v.3, p.137-149, Sept. 2000.

SAIF, L. J.; BOHL, E. H.; THEIL, K. W.; CROSS, R. F.; HOUSE, J. A. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 105-111, Jul 1980.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTA CATARINA. Secretaria do Estado da Saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. **Boletim epidemiológico**. N. 01, 2009. Disponível em: < <http://www.dive.sc.gov.br> >. Acesso em 25 de out. 2011.

SANTOS, N.; GOUVEA, V. Infecções por rotavírus: aspectos atuais. **Jornal Brasileiro de Patologia**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p. 94-102, Abr./Jun. 1997.

SANTOS, N.; HOSHINO, Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. **Reviews in Medical Virology**, v. 15, n. 1, p. 29-56, Jan/Feb. 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. **Journal of Clinical Microbiology**, Spencer Wood, v. 36, n. 9, p. 2727–2729, Sept. 1998.

SANTOS, N. S. O.; SOARES, C. C. Viroses entéricas. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D (Ed.). **Introdução à Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2 ed., 2008. p. 147-176.

SCHAUB, S. A.; OSHIRO, R. K. Public health concerns about caliciviruses as waterborne contaminants. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, supl 2, p. S374-80, May 2000.

SCHUMANN, T.; HOTZEL, H.; OTTO, P.; JOHNE, R. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. **Virology**, London, v. 386, n. 2, p. 334-343, April 2009.

SCIPIONI, A.; MAUROY, A.; VINJÉ, J.; THIRY, E. Animal noroviruses. **Veterinary Journal**, v. 178, n. 1, p. 32-45, Oct 2008.

SILVESTRI, L. S.; TARAPOREWALA, Z. F.; PATTON, J. T. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded rna synthesis are made in viroplasm. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, n. 14, p. 7763-7774, July 2004.

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**. London, v. 385, n. 1, p. 58-67, Jan. 2009.

SOUZA JUNIOR, J. C. de. Perfil sanitário de bugios ruivos, *Alouatta guariba clamitans* (Cabrera, 1940) (primates: atelidae): um estudo com animais recepcionados e mantidos em perímetro urbano no município de Indaial, Santa Catarina – Brasil. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, SC, 2007.

SVOBODA, W. K. Vigilância de epizootias em primatas não-humanos (PNH) como instrumento de monitoramento de arboviroses e outras viroses de interesse em Saúde Pública. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Londrina – Paraná, 2007.

TIMENETSKY, M. C. S. T.; SANTOS, N.; GOUVEA, V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in Sao Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. **Journal of Clinical Microbiology**, Spencer Wood, v. 32, n. 10, p. 2622–2624, Oct. 1994.

TORRES MAN, S.E.; ALMEIDA, M.A.B.; CRUZ, L.L.; SPERB, A.F. Vigilância da Febre Amarela Silvestre no Rio Grande do Sul. In: **Boletim Epidemiológico da SESA-RS do Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2003, v. 6.

URSU, K.; KISFALI, P.; RIGÓ, D.; IVANICS, E.; ERDÉLYI, K.; DÁN, A.; MELEGH, B.; MARTELLA, V.; BÁNYAI, K. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. **Archives of Virology**. New York, v. 154, n. 8, p. 1365-1369. July 2009.

VALENZUELA, S.; PIZARRO, J.; SANDINO, A. M.; VASQUEZ, M; FERNANDEZ, J.; HERNANDEZ, O.; PATTON, J.; SPENCER, E. Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. **Journal of Virology**, Washington, v. 65, n. 7, p. 3964-3967, July 1991.

VAN MAARSEVEEN, M.; WESSELS, E.; DE BROUWER, C. S.; VOSSEN, A. C.; CLAAS, E. C. Diagnosis of viral gastroenteritis by simultaneous detection of Adenovirus group F, Astrovirus, Rotavirus group A, Norovirus genogroups I and II, and Sapovirus in two internally controlled multiplex real-time PCR assays. **Journal of Clinical Virology**, v. 49, n. 3, p. 205-10, Nov 2010.

VANREGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M. In. **Virus Taxonomy**. The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000. p. 395-433.

VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; RODRIGUES, S.G.;

TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; MONTEIRO, H.A.O.; CRUZ, A.C.R.; BARROS, V.L.R.; SOUZA, M.R.S.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. Yellow fever in Pará state, Amazon region of Brazil, 1998-1999: entomologic and epidemiologic findings. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 565-569, 2001.

VINJÉ, J.; VENNEMA, H.; MAUNULA, L.; VON BONSDORFF, C. H.; HOEHNE, M.; SCHREIER, E.; RICHARDS, A.; GREEN, J.; BROWN, D.; BEARD, S. S.; MONROE, S. S.; DE BRUIN, E.; SVENSSON, L.; KOOPMANS, M. P. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1423-33, Apr 2003.

VONSOVER, A.; SHIF, I.; SILBERSTEIN, I.; RUDICH, H.; ABOUDY, Y.; MENDELSON, E.; SHULMAN, L.; NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O. Identification of feline- and canine-like rotaviruses isolated from humans by restriction fragment length polymorphism assay. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 7, p. 1783-1787, July 1993.

WANG, Y.; TU, X.; HUMPHREY, C.; MCCLURE, H.; JIANG, X.; QIN, C.; GLASS, R.I.; JIANG, B. Detection of viral agents in fecal specimens of monkeys with diarrhea. **Journal of Medical Primatology**, v. 36, n. 2, p. 101-107, April 2007.

WARD, R. L.; NAKAGOMI, O.; KNOWLTON, D. R.; McNEAL, M. M.; NAKAGOMI, T.; CLEMENS, J. D.; SACK, D. S.; SCHIFF, G.M. Evidence for natural reassortants of human rotaviruses belonging to different genogroups. **Journal of Virology**, Washington, v. 64, n.7, p. 3219-3225, July 1990.

WESTERMAN, L. E.; XU, J.; JIANG, B.; MCCLURE, H. M.; GLASS, R. I. Experimental infection of pigtailed macaques with a simian rotavirus, YK-1. **Journal of Medical Virology**, v. 75, n. 4, p. 616-625, April 2005.

WIDDOWSON, M. A.; SULKA, A.; BULENS, S. N.; BEARD, R. S.; CHAVES, S. S.; HAMMOND, R.; SALEHI, E. D.; SWANSON, E.; TOTARO, J.; WORON, R.; MEAD, P. S.; BRESEE, J. S.; MONROE, S. S.; GLASS, R. I. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 95-102, Jan, 2005.

WIDDOWSON, M. A.; ROCKX, B.; SCHEPP, R.; VAN DER POEL, W. H.; VINJE, J.; VAN DUYNHOVEN, Y. T.; KOOPMANS, M. P. Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands. **Journal Medical of Virology**, v. 76, n. 1, p.119-28, May 2005.

WOODE, G. N.; J. BRIDGER; HALL, G. A.; JONES, J. M.; JACKSON, G. 1976. The

isolation of reovirus-like agents (rotaviruses) from acute gastroenteritis of piglets. **Journal of Medical Microbiology**. Spencers Wood, v. 9, n. 2, p. 203-209, May 1976.

WOODE, G. N.; BRIDGER, J. C. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. **Journal Medical of Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 441-52, NoV 1978.

World Health Organizations – WHO. Global and national estimates of deaths under age five attributable to rotavirus infection: 2004. **Global national estimates 2004**.

World Organisation for Animal Health – OIE. **Código Sanitário para Animais Terrestres**. Código Sanitário de Animais Terrestres, 2008.

YEAGER, M.; DRYDEN, K. A.; OLSON, N. H.; GREENBERG, H. B.; BAKER, T. S. Three-dimensional Structure of Rhesus Rotavirus by Cryoelectron Microscopy and Image Reconstruction. **The EMBO Journal**, London, v. 13, n. 5, p. 1011-1018, Mar. 1994.

ZÁRATE, S.; ESPINOSA, R.; ROMERO, P.; MÉNDEZ, E.; ARIAS, C. F.; LÓPEZ, S. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. **Journal of Virology**, Washington, v. 74, n. 2, p. 593-599, Jan. 2000.

ZHENG, D. P.; ANDO, T.; FANKHAUSER, R. L.; BEARD, R. S.; GLASS, R. I.; MONROE, S. S. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. **Virology**. v. 346, n.2, p. 312-23, Mar 2006.

ZINTZ, C.; BOK, K.; PARADA, E.; BARNES-ELEY, M.; BERKE, T.; STAAT, M. A.; AZIMI, P.; JIANG, X.; MATSON, D. O. Prevalence and genetic characterization of caliciviruses among children hospitalized for acute gastroenteritis in the United States. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 5, n. 3, p. 281-90, Apr 2005

GLOSSÁRIO

CORE: proteínas encontradas principalmente em vírus DNA e RNA icosaédricos. Elas consistem em proteínas diretamente associadas com os ácidos nucléicos dentro da núcleo.

ELETROFEROTIPOS: O RNA genômico pode ser extraído de partículas virais semi-purificadas e separado de acordo com as massas moleculares e a velocidade de migração, utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), apresentando um padrão eletroforético, ou eletroferotipo, típico para esses vírus.

EPIZOOTIAS: epidemias que acometem animais.

GENOGRUPOS: O termo genogrupo indica um grupo de vírus que pode ser classificado num mesmo grupo genético, com base na homologia dos seus segmentos genômicos.

GRUPOS: A classificação em grupo é determinada pela proteína VP6, codificada pelo segmento genômico 6, localizada no capsídeo intermediário do vírus e é a proteína mais abundante, através de testes sorológicos como ensaio imunoenzimático (EIE).

RESERVATÓRIO: considerada uma espécie principal, objeto de ação sanitária, os demais vertebrados capazes de atuar como fonte de infecção no processo de disseminação de uma determinada doença são considerados como reservatórios.

SOROTIPOS: A designação para sorotipo é denominada pela expressão de epítomos (determinadas regiões na proteína viral ao qual o anticorpo se liga) de neutralização em ambas as proteínas ou seus segmentos genômicos, VP4 e VP7

VÍRION: é uma partícula viral completa que está fora da célula hospedeira

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – LISTA DE REAGENTES
APÊNDICE 2 – TAMPÕES E SOLUÇÕES

APÊNDICE 1 – LISTA DE REAGENTES

1. 2-Mercaptoetanol ($C_2H_6O_5$) P.M. 78,13 (Fluka®)
2. Acido etilenodiaminotetraacido Sal di-sodico – EDTA, P.A. ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_{22}H_2O$) P.M. 372,24 (ReagenR)
3. Alcool isoamilico ($(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$) P.M. 88,15 (SynthR)
4. Cloreto de cálcio
5. Cloreto de Sodio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (ReagenR)
6. Cloroformio, P.A. ($CHCl_3$) P.M. 119,38 (DinamicaR)
7. Dodecil Sulfato de Sodio – Lauril Sulfato de Sodio – SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) P.M. 288,38 (SynthR)
8. Hidroxido de Sodio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Mallinckrodt ChemicalsR)
9. Isotiocianato de guanidina (PM 118,16) (Gibco BRL®)
10. TRIS (PM 121,14) (Invitrogen®)
11. Triton X-100 (Gibco BRL®)
12. Agua DEPC (Dietil pirocarbonato) (Invitrogen Life TechnologiesR)
13. Agarose (Gibco BRLR)
14. Persulfato de amônio PA
15. TEMED
16. Borohidreto de sódio (PM 37,83) (Sigma®)
17. Bisacrilamida (PM 154,2) (Sigma®)
18. Acetona, P.A. (CH_3COCH_3) P.M. 58,08 (DinamicaR)
19. Ácido acético PA (PM 60,05) (Artquímica®)
20. Sílica (PM 60,08) (Sigma®)
21. Acrilamida (PM 71,08) (Gibco BRL®)
22. Ácido aminoacético (PM 75,07) (Synth®)
23. Formaldeído PA (PM 30,03) (Synth®)

APÊNDICE 2 TAMPÕES E SOLUÇÕES

1. TRIS/Ca²⁺

- 50 mM Tris-HCl
- 10 mM NaCl
- 1,5 mM 2-mercaptoetanol
- 3 mM CaCl₂ pH 7,2

2. Solução L6

- 120 g de isotiocianato de guanidina
- 100 mL de TRIS-HCL 0,1M pH 6,4
- 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
- 2.6 g de triton x 100

3. Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)

- 25 mL fenol saturado
- 24 mL clorofórmio
- 1 mL álcool isoamílico

4. Hidratação da Sílica

- 60 g sílica
- 500 mL H₂O bd q.s.p.
- Agitar e permanecer em repouso por 24 horas
- Desprezar 430 mL do sobrenadante por sucção
- Ressuspender a sílica em 500 mL H₂O bd q.s.p
- Permanecer em repouso por 5 horas. Desprezar 400 mL do sobrenadante
- Adicionar 600 µL de HCL (32% p/v) ajustar pH (pH 2,0)
- Aliquotar e autoclavar

5. Solução L2

- 120 g de isotiocianato de guanidina
- 100 ml de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

6. Lower gel

- 5 mL de Lower TRIS
- 3 ml de acrilamida/bisacrilamida
- 50 µL TEMED
- 0,56 mL persulfato de amônio 2%
- 11,44 mL de água bidestilada.

7. Top gel

- 2,5 mL de Upper TRIS
- 0,7 ml de acrilamida/bisacrilamida
- 50 µL TEMED
- 0,60 mL persulfato de amônio 2%
- 6,20 mL de água bidestilada 3,5%

8. Lower TRIS pH 8,8

- 36,34 g TRIS
- 200 mL q.s.p. H₂O destilada

9. Upper TRIS pH 6,8

- 12,12 g TRIS
- 200 mL q.s.p. H₂O destilada

10. Solução Acrilamida/Bisacrilamida

- 1,3 g bisacrilamida
- 50 g acrilamida
- 100 mL q.s.p. H₂O destilada

11. Tampão de corrida para eletroforese em gel de poliacrilamida

- 30 g TRIS
- 14,4 g ácido aminoacético (glicina)
- 1 L H₂O bd q.s.p.

12. Solução reveladora para gel de poliacrilamida

- 9 g hidróxido de sódio
- 2,5 mL formaldeído
- 300 ml H₂O destilada q.s.p
- 0,06 g borohidreto de sódio

13. Solução Fixadora para gel de poliacrilamida

- 30 mL álcool etílico absoluto
- 1,5 mL ácido acético
- 300 mL H₂O destilada q.s.p

14. Solução corante para gel de poliacrilamida

- 0,55 g nitrato de prata
- 300 mL H₂O destilada q.s.p