



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**



**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GÊNICA DE ROTAVÍRUS DE PACIENTES
ATENDIDOS EM HOSPITAIS PÚBLICOS INFANTIS DA CIDADE DE MANAUS,
AMAZONAS, ENTRE OS ANOS DE 2007 E 2008**

KAREN CAMPOS BALIEIRO

**MANAUS
2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**



**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GÊNICA DE ROTAVÍRUS DE PACIENTES
ATENDIDOS EM HOSPITAIS PÚBLICOS INFANTIS DA CIDADE DE MANAUS,
AMAZONAS, ENTRE OS ANOS DE 2007 E 2008**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

**NOME: KAREN CAMPOS BALIEIRO
ORIENTADORA: DRA. PATRÍCIA PUCCINELLI ORLANDI
CO-ORIENTADORA: DRA. LEIDIANE AMORIM SOARES**

**MANAUS
2013**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B186d Balieiro, Karen Campos Balieiro
Detecção e caracterização gênica de rotavírus de pacientes atendidos em hospitais públicos infantis da cidade de Manaus, Amazonas, entre os anos de 2007 e 2008 / Karen Campos Balieiro Balieiro. 2013
102 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Patrícia Puccineli Orlandi
Coorientadora: Leidiane Amorim Soares
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Doença Diarreica. 2. Rotavírus. 3. Epidemiologia. 4. Caracterização Molecular. I. Orlandi, Patrícia Puccineli II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedico ao meu pai Elzenêr Balieiro (*i.m.*) que, além da saudade,
deixou a melhor herança que alguém poderia ter:
valores e princípios.

AGRADECIMENTOS

À Deus, o único possuidor das verdades que a alma humana tanta procura por ser Ele a própria Verdade.

À minha mãe Rosângela e irmãos Elzenêr e Rafael, pelo amor, compreensão e apoio ao longo de todos esses anos.

À Dra. Aya Sadahiro, pela ótima orientação no estágio à docência e seus valiosos ensinamentos.

Ao Dr. André Mariúba por toda contribuição e apoio pelos quais serei eternamente grata.

Ao Dr. Paulo Nogueira e Dra. Patrícia Orlandi por me permitirem fazer parte de suas equipes e pela oportunidade de crescimento não somente profissional mas também pessoal.

A Dr. Lee pela solicitude na orientação para a realização das análises filogenéticas.

Aos companheiros desde a graduação Yury, Edilene, Paula e Diogo, e aos amigos da Fiocruz Leidiane, Luciana, Davi, Geise, Michele, Neide, Andréia, Vani, pessoas tão importantes nesta fase da minha vida.

Às amigas, Raquel, Helen e Anabel, minha eterna gratidão pelo presente valioso da verdadeira amizade.

Aos amigos da Igreja Batista Kerygma, minha segunda família, por todo o apoio e incentivo.

Ao PPGIBA-UFAM, todos os professores e colegas, pela oportunidade da qualificação profissional e crescimento acadêmico.

À CAPES pelo financiamento da minha bolsa de estudos.

À Fiocruz AM - Instituto Leônidas e Maria Deane por permitir a realização desta pesquisa em suas dependências e por contribuir, de um modo geral, para o avanço das pesquisas científicas neste país.

Fica o meu muito

OBRIGADA !!!

RESUMO

As gastroenterites humanas estão entre as doenças de maior impacto na saúde pública ao nível mundial. São diversos os agentes etiológicos causadores da diarreia, merecendo destaque o rotavírus, patógeno viral proeminente na gênese de gastroenterite aguda grave na infância, sendo responsável por mais de 200 mil mortes de crianças em todo o mundo. O rotavírus é constituído por um genoma de 11 segmentos de RNA dupla fita que codificam 6 proteínas estruturais (VPs) e 6 proteínas não-estruturais (NSPs). A atual classificação dos rotavírus tem base na caracterização gênica dos 11 segmentos virais para a identificação de seus respectivos genótipos, designados em conjunto como genótipos de constelação. A vigilância epidemiológica que inclui a caracterização molecular é uma importante ferramenta para o estudo da dinâmica de variações das cepas diante de fatores evolutivos como a implementação da vacina Rotarix (GlaxoSmithKline), introduzida no Brasil desde 2006. A finalidade deste estudo foi realizar análises epidemiológicas, detecção e caracterização de genes de rotavírus que infectaram crianças com até 10 anos de idade, atendidas em hospitais públicos de Manaus entre os anos de 2007 e 2008. Foram coletadas 1337 amostras diarreicas. Observou-se um percentual de 5,4 % de positividade para rotavírus. Foram identificados os genótipos virais através das reações em cadeia pela polimerase precedida da transcrição reversa. O genótipo G2P[4] foi encontrado em 93% dos casos, seguido do G[NT-não tipado]P4 em 6% e G2P[9] em 1% das amostras. Dentre as 73 amostras detectadas nesta pesquisa, 58 eram elegíveis à atual vacina. As análises filogenéticas revelaram um padrão de agrupamento das sequências gênicas em *clusters* que apresentaram similaridade com amostras provenientes de Belém (Brasil) e da China.

Palavras-chave: doença diarreica, rotavírus, epidemiologia, caracterização molecular.

ABSTRACT

The human gastroenteritis are among the diseases of greatest public health impact worldwide. There are several etiologic agents of diarrhea, with emphasis rotavirus, viral pathogen prominently in the genesis of severe acute gastroenteritis in childhood, accounting for over 450,000 deaths in children worldwide. The rotavirus genome consists of a 11 segment of double stranded RNA encoding six structural proteins (VPs) and five non-structural proteins (NSPs). Classification of rotavirus serotypes and genotypes is based on the epitopes of the glycoprotein VP7 neutralized, called G, and VP4 protease-sensitive protein called P, which generates a binary classification scheme G and P. Epidemiological studies of molecular characterization of genes encoding for proteins of rotavirus are essential for assessing the effectiveness of the vaccine Rotarix (GlaxoSmithKline), introduced in Brazil since 2006, in addition to assessing the possible emergence of new viral genotypes. The aim of this study was to identify and characterize genes of rotavirus in feces of children with diarrhea in Manaus between the years 2007 and 2008. 1337 samples were collected from diarrheal children under 10 years old in the city of Manaus, between the years 2007 and 2008. There was a percentage of 5.4% of positive samples for rotavirus. Viral genotypes were identified through polymerase chain reactions preceded by reverse transcription. The genotype G2P[4] was found in 93% of cases, followed by G [NT-untyped] P4 in 6% and G2P[9] 1% of the samples. Among the 73 samples detected in this study, 58 were eligible for the current vaccine. Phylogenetic analysis revealed a pattern of clustering of gene sequences into clusters that showed similarity with samples from Belém (Brazil) and China.

Keywords: diarrheal disease, rotavirus epidemiology, molecular characterization

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 – Principais causas da mortalidade infantil no mundo. A diarreia ocupa o quarto lugar na escala mundial, matando mais crianças que a malária, a AIDS e o sarampo.....	18
Figura 2 – Eletromicrografia de transmissão de partículas intactas de rotavírus com dupla camada.....	27
Figura 3 – Genoma de dsRNA de rotavírus.....	28
Figura 4 – Representação esquemática do rotavírus.....	28
Figura 5 – Ciclo de replicação do rotavírus.....	31
Figura 6 – Lúmen do íleo infectado por rotavírus.....	32
Figura 7 – Esquema dos mecanismos de patogênese viral e imunidade.....	34
Figura 8 – Ilustração esquemática dos genótipos de VP4.....	45
Figura 9 – Ilustração esquemática dos genótipos de VP7.....	45
Figura 10 – Ilustração da análise dos picos dos sequenciamentos realizada no programa Chromas Lite.....	49
Figura 11 – Perfis eletroforéticos de amostras positivas para rotavírus. CC: controle curto, C: curto, L: longo.....	52
Figura 12 – Gel de agarose 1%, mostrando produtos da amplificação por RT-PCR dos genes VP7 com 244pb, característico de G2 e VP4 com 483pb típico de P4, respectivamente, com os marcadores de peso molecular de 100pb (Ludwing Biotec).....	59
Figura 13 - Dendrograma filogenético do gene que codifica a proteína estrutural de rotavírus VP1, representando a classificação das cepas estudadas. O método Neighbor-joining e Kimura modelo 2 parâmetros foram utilizados para a reconstrução filogenética.....	65
Figura 14 - Dendrograma filogenético do gene que codifica a proteína estrutural de rotavírus VP2, representando a classificação das cepas estudadas. O método Neighbor-joining e Kimura modelo 2 parâmetros foram utilizados para a reconstrução filogenética.....	66
Figura 15 - Dendrograma filogenético do gene que codifica a proteína estrutural de rotavírus VP3, representando a classificação das cepas estudadas. O método Neighbor-joining e Kimura modelo 2 parâmetros foram	

utilizados para a reconstrução filogenética.....	67
Figura 16 – Dendrograma filogenético do gene que codifica a proteína não-estrutural de rotavírus NSP3, representando a classificação das cepas estudadas. O método Neighbor-joining e Kimura modelo 2 parâmetros foram utilizados para a reconstrução filogenética.....	68
Figura 17 – Dendrograma filogenético do gene que codifica a proteína não-estrutural de rotavírus NSP5, representando a classificação das cepas estudadas. O método Neighbor-joining e Kimura <i>2 parameter model</i> foram utilizados para a reconstrução filogenética.....	69
Gráfico 1 – Probabilidade de óbito infantil, com idade de até 5 anos, a cada 1.000 nascidos vivos nas regiões da WHO. O gráfico indica a redução das taxas de mortalidade infantil em todas as regiões quando comparados os anos de 1990 e 2009.....	18
Gráfico 2 – Casos de DDA por faixa etária no Brasil entre 2000 e início de 2012. Quase um milhão de crianças menores de 5 anos foram acometidas pela DDA em 2011.....	19
Gráfico 3 – Estimativa de incidência de casos de DDA por faixa etária no Brasil..	19
Gráfico 4 – Óbitos por DDA por faixa etária no Brasil. Nos últimos 10 anos observa-se a diminuição dos índices de mortalidade entre menores de 5 anos..	20
Gráfico 5 – Óbitos infantis por causas evitáveis notificados nas regiões brasileiras e os números nacionais. A região com menor índice de mortalidade infantil evitável é o Centro-oeste, e as regiões com os índices mais elevados são o Nordeste e o Sudeste.....	21
Gráfico 6 – Óbitos infantis por causas evitáveis no Estado do Amazonas e na região Norte do Brasil. Em 2010 foram registrados 731 óbitos infantis por causas evitáveis no Amazonas.....	21
Gráfico 7 – Distribuição das amostras coletadas ao longo dos anos de 2007 e 2008 em três hospitais e prontos-socorros da criança na cidade de Manaus.....	51
Gráfico 8 – Distribuição das amostras positivas para rotavírus, encontradas ao longo dos meses de julho de 2007 a dezembro de 2008.....	52
Gráfico 9 – Comparação entre o número de amostras diarreicas coletadas e o número correspondente de amostras rotavírus positivas, fazendo referência a cada mês do período da coleta.....	54
Gráfico 10 – Positividade para rotavírus indicando ligeira predominância da ocorrência dos casos no sexo masculino.....	55

Gráfico 11 – Distribuição das amostras positivas para o rotavírus conforme a idade em meses. Crianças de 0 a 24 meses representam 81% das infecções investigadas.....	56
Gráfico 12 – Percentual das amostras RV positivas de acordo com o período de amamentação. Crianças que deixaram de ser amamentadas a partir de 1 mês até um ano de idade representaram 53 % dos casos de positividade para RV.....	56
Gráfico 13 – Distribuição das amostras positivas para rotavírus por zonas da cidade de Manaus.....	57
Gráfico 14 – Distribuição dos casos RV positivos de acordo com a origem da água para consumo.....	57
Gráfico 15 – Sinais e sintomas dos casos de diarreia causada por rotavírus.....	58
Gráfico 16 – Número de amostras correspondentes aos genótipos de rotavírus determinados nas 73 amostras positivas. Houve predominância do genótipo G2P[4].....	59
Gráfico 17 – Porcentagem de detecção dos genótipos G(1) e P (2). G[NT] – genótipo G não tipado.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parasitas entéricos, adaptado.....	23
Tabela 2 – Bactérias entéricas.....	23
Tabela 3 – Vírus entéricos.....	24
Tabela 4 – Soluções para visualização das bandas em gel de poliacrilamida.....	44
Tabela 5 – <i>Pool</i> de iniciadores para definição do genótipo P.....	44
Tabela 6 – <i>Pool</i> de iniciadores para definição do genótipo G.....	45
Tabela 7 – Reagentes utilizados na transcrição reversa para confecção do cDNA	46
Tabela 8 – Reagentes utilizados para a PCR dos genes VP4 e VP7.....	46
Tabela 9 – Reagentes para realização do Nested-PCR.....	47
Tabela 10 – Iniciadores para a amplificação dos genes VP1, VP2, VP3.....	48
Tabela 11 – Iniciadores para amplificação dos gene NSP3, NSP5.....	48
Tabela 12 – Número de casos de gastroenterite causada por rotavírus e sua duração em dias.....	57
Tabela 13 – Amostras positivas de rotavírus do grupo A detectadas nesta pesquisa, elegíveis à vacinação.....	61
Tabela 14 – Constelação de genótipos de 14 amostras analisadas neste estudo. Sequência não obtida (X). Genótipo não determinado (-). Para a orientação gênica foi utilizado o protótipo de origem humana TB-Chen, descrito por Matthijnsens et al., 2008.....	62

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- BBM** – *Brush border membrane*
- CEP** – Comitê de ética em pesquisa
- CDC** – *Centers for Diseases, Control and Prevention*
- cDNA** – Ácido desoxirribonucleico recombinante (*desoxiribonucleic acid*)
- DDA** – Doença diarreica aguda
- DLP** – Dupla camada proteica (*double-layer protein*)
- ELISA** – Ensaio imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
- G** – Glicoproteína
- IgA** – Imunoglobulina classe A
- IgG** – Imunoglobulina classe G
- IL** – Interleucina
- IFN** – Interferon
- IEC** – Células do epitélio intestinal (*cell of the intestinal epithelium*)
- MDDA** – Monitorização da doença diarreica aguda
- ME** – Microscopia eletrônica
- M** – Molar
- NSP** – Proteína não estrutural (*non-structural protein*)
- NCBI** – *National Center for Biotechnology Information*
- ONU** – Organização das Nações Unidas
- P** – Protease
- PCR** – Reação em Cadeia pela Polimerase (*polymerase chain reaction*)
- PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida (*polyacrylamide gel electrophoresis*)
- pH** – Potencial hidrogeniônico
- RNA** – Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)
- RE** – Retículo endoplasmático
- RV** – Rotavírus
- RdRp** – RNA polimerase dependente de RNA
- RPM** – Rotações por minuto
- SUS** – Sistema único de saúde
- TNF** – Fator de Necrose Tumoral (*tumor necrosis factor*)
- TLP** – Tripla camada proteica (*triple-layer protein*)

Th – T auxiliar (*T helper*)

TEMED – Tetrametilenodiamina

UNICEF – *United Nations Children Found*

VP – Proteína viral (*viral protein*)

VORH – Vacina oral de rotavírus humano

WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1. Gastrenterites.....	17
2.2. Rotavírus.....	24
2.2.1. Epidemiologia.....	24
2.2.2. Histórico.....	26
2.2.3. Classificação, Morfologia e Genoma Viral.....	27
2.2.4. Ciclo de Replicação Viral.....	30
2.2.5. Patogênese e Imunidade.....	32
2.2.6. Epidemiologia das cepas virais.....	36
2.2.7. Vacina.....	36
3. JUSTIFICATIVA.....	39
4. OBJETIVOS.....	40
4.1. Objetivo geral.....	40
4.2. Objetivos específicos.....	40
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
5.1. Coleta das amostras.....	41
5.2. Critérios de inclusão das amostras.....	44
5.3. Entrevista.....	42
5.4. Comitê de Ética em Pesquisa.....	42
5.5. Preparo da suspensão fecal.....	42
5.6. Extração do genoma viral.....	42
5.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	43

5.8. Caracterização gênica do rotavírus (RT-PCR e Nested-PCR).....	44
5.8.1. Iniciadores dos genes VP4 e VP7.....	44
5.8.2. RT-PCR VP7e VP4.....	45
5.8.3. Nested-PCR.....	47
5.8.4. Iniciadores dos genes VP1, VP2, VP3, NSP3 e NSP5.....	47
5.8.5. RT-PCR VP1, VP2, VP3 NSP3 e NSP5.....	48
5.8.6. Sequenciamento dos amplicons e análise filogenética.....	49
6. RESULTADOS.....	51
6.1. Amostragem e percentual de infecção por rotavírus do grupo A	51
6.2. Sazonalidade dos casos de gastroenterite e rotavirose.....	53
6.3. Caracterização dos genótipos virais circulantes em Manaus.....	58
6.4. Vacinação do rotavírus.....	60
6.5. Caracterização filogenética dos genes que codificam as proteínas VP1, VP2, VP3, NSP3, NSP5.....	61
7. DISCUSSÃO.....	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
APÊNDICES.....	84
ANEXOS.....	99

1 INTRODUÇÃO

A gastroenterite é uma doença que destaca-se mundialmente por assumir elevados números de hospitalizações e mortalidade infantil tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. O engajamento de diversos países no combate à mortalidade por causas evitáveis como a diarreia aguda, trouxe uma drástica redução destes índices nos últimos anos. Dentre os patógenos causadores da diarreia grave está o Rotavírus, um vírus enterico causador de mais de duzentas mil mortes anuais, afetando principalmente crianças menores de 5 anos de idade.

Estima-se que 2,5 bilhões de pessoas sejam acometidas pelas gastroenterites anualmente em todo mundo, afetando principalmente os países de baixa renda, um vez que a vulnerabilidade à qual as pessoas são expostas, devido à ausência de condições básicas de higiene como saneamento e água tratada, é um fator que contribui para a disseminação e agravamento da doença. A doença diarreia aguda ou DDA, é uma doença evitável e tratável. Por esta razão, organismos internacionais como a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Organização das Nações Unidas (ONU) e a Fundação Das Nações Unidas para as Crianças (UNICEF) aliaram-se para elaborar planos e estratégias para o combate à mortalidade infantil.

O Rotavírus tornou-se um dos principais vilões da saúde pública na infância. Na década de 80, os índices de mortalidade nesta faixa etária chegaram a oitocentas mil mortes anuais entre menores de 5 anos de idade. Com a implementação da terapia de reidratação oral e utilização de métodos profiláticos como as atuais vacinas licenciadas, atualmente este índice reduziu para cerca de duzentas mil mortes infantis anuais. Houve um expressivo declínio do número de mortes e de DDA na forma grave. A vacina têm demonstrado elevada eficácia na prevenção da doença, porém o Rotavírus ainda está entre os maiores causadores de mortalidade infantil mundial.

Deste modo, o constante monitoramento da eficácia da vacina através de estudos genômicos e epidemiológicos do vírus e suas principais cepas circulantes constituem uma importante ferramenta para manter a qualidade deste método profilático bem como progredir na redução dos índices de mortalidade até que se alcance a erradicação das mortes causadas por diarreia infantil.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Gastreenterites

A Organização das Nações Unidas (ONU) estipulou no ano de 1990 as Metas de Desenvolvimento do Milênio, que incluíram a redução de dois terços do número de mortes infantis no mundo até 2015. De acordo com dados do relatório de estatísticas da saúde mundial de 2011, publicado pela *World Health Organization* (WHO), houve um expressivo declínio nas taxas de mortalidade infantil das suas regiões, ao longo dos últimos anos (gráfico 1). Em informe da WHO e *United Nations Children Found* (UNICEF) (2013), indicadores apontaram que a mortalidade infantil mundial caiu de 12 milhões em 1990 para 6,9 milhões em 2011. Apesar disso, doenças evitáveis como a diarreia, permanecem entre as principais causas de morbidade e mortalidade infantil em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento.

As gastreenterites humanas são classificadas como uma das doenças de maior impacto na saúde pública ao nível mundial. A cada ano, uma estimativa de 2,5 bilhões de crianças menores de 5 anos são acometidas pelas gastreenterites. Mais da metade desses casos ocorrem nas regiões da África e no Sul da Ásia, locais onde são notificados cerca de 90% das mortes decorrentes da diarreia (WHO/ UNICEF, 2013).

A doença diarreica aguda (DDA) contabiliza 11% dos óbitos na faixa etária infantil, sendo a quarta doença que mais mata crianças na escala mundial, o que equivale a aproximadamente um milhão e duzentas mil mortes por ano (Figura 1). Em maior número que a AIDS, a malária e o sarampo juntos, a diarreia é a causa de 1 entre 9 mortes na infância, levando à óbito 2.195 crianças por dia. É a segunda principal causa de falecimentos entre menores de 5 anos de idade e, quando neste caso combinada com o HIV, torna-se 11 vezes mais mortal (WHO, 2012; CDC, 2012).

Na região das Américas, a DDA é responsável por 4% das mortes durante a infância e corresponde a 3% do índice brasileiro de mortalidade infantil (WHO, 2012).

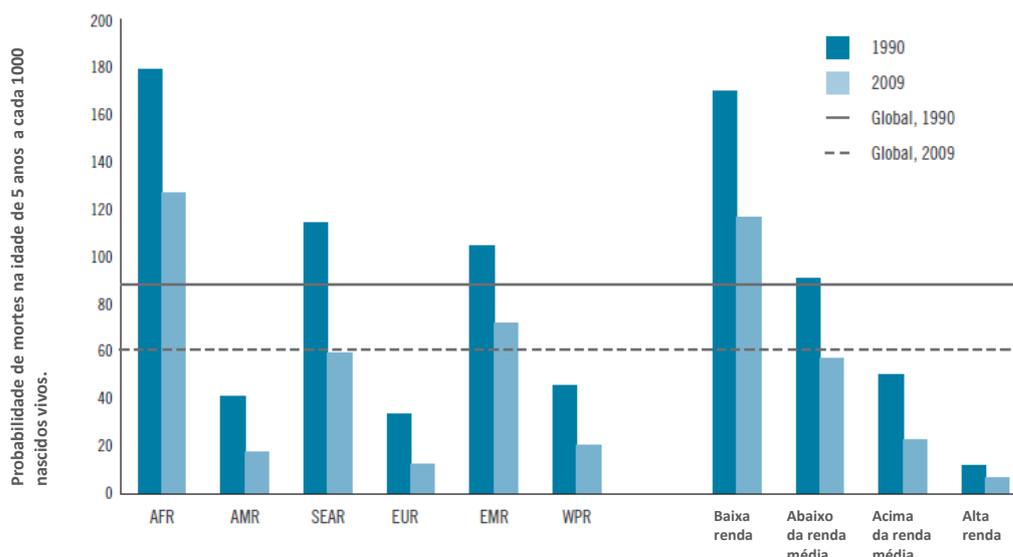


Gráfico 1 – Probabilidade de óbito infantil, com idade de até 5 anos, a cada 1.000 nascidos vivos nas regiões da WHO. O gráfico indica a redução das taxas de mortalidade infantil em todas as regiões quando comparados os anos de 1990 e 2009. Fonte: WHS 2011, WHO, adaptado.

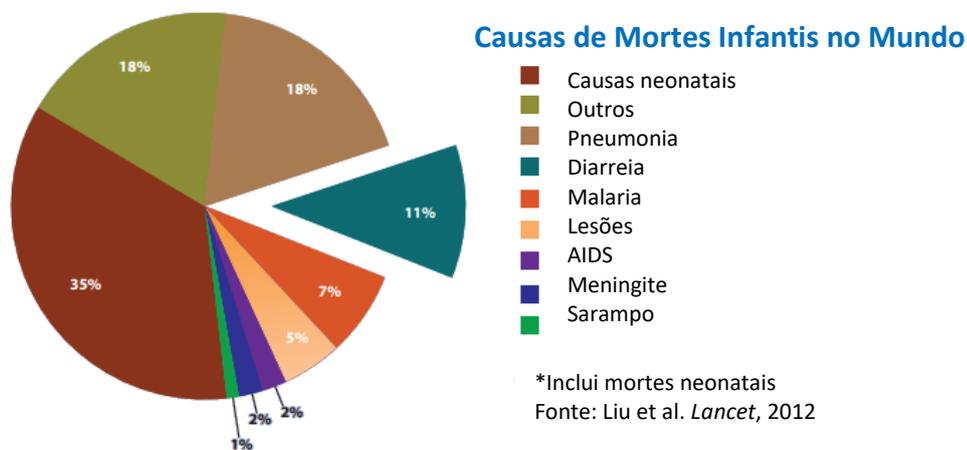


Figura 1 – Principais causas da mortalidade infantil no mundo. A diarréia ocupa o quarto lugar na escala mundial, matando mais crianças que a malária, a AIDS e o sarampo. Fonte: *Centers for Diseases, Control and Prevention (CDC). Diarrhea: Common Illness, Global Killer, 2012*, adaptado.

A doença diarreica aguda constitui um dos mais importantes problemas de saúde pública do Brasil. Devido à sua magnitude, em 1994 foi instituído a Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas (MDDA), um sistema de vigilância de avaliação contínua, presente em

mais de 70% dos municípios do país, que notifica os dados referentes à ocorrência da doença diarreica aguda ao Ministério da Saúde do Brasil (MS, 2010).

Foram notificados mais de 34 milhões de episódios de diarreia nos últimos anos, e registrados mais de 53 mil óbitos por DDA no Brasil entre os anos de 2000 e 2010. Mais de 1 milhão de crianças menores de 5 anos foram acometidas pela DDA somente no ano de 2010 (gráfico 2).

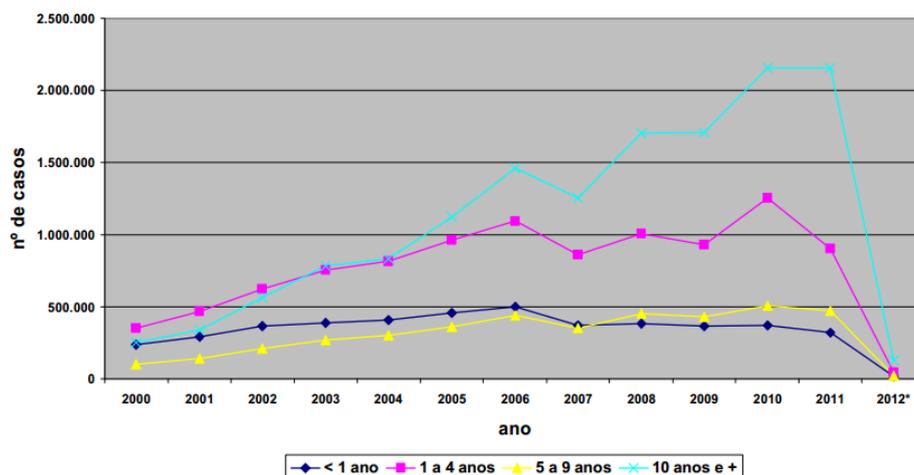


Gráfico 2 - Casos de DDA por faixa etária no Brasil entre 2000 e início de 2012. Quase um milhão de crianças menores de 5 anos foram acometidas pela DDA em 2011. Fonte: Portal da Saúde SUS, 2013.

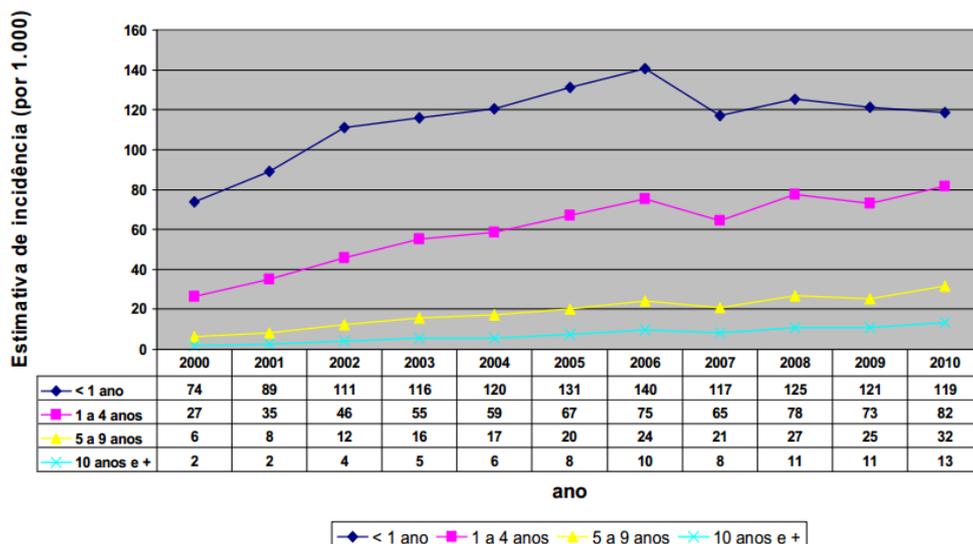


Gráfico 3 - Estimativa de incidência de casos de DDA por faixa etária no Brasil. Fonte: Portal da Saúde SUS, 2013.

A incidência da doença na faixa etária infantil, no mesmo ano, foi de 119 casos a cada 1000 crianças menores de 1 ano e 82 casos a cada 1000 crianças entre 1 e 5 anos (gráfico 3). Em 2010, 852 crianças foram a óbito antes que completassem o quinto ano de vida no Brasil (gráfico 4).

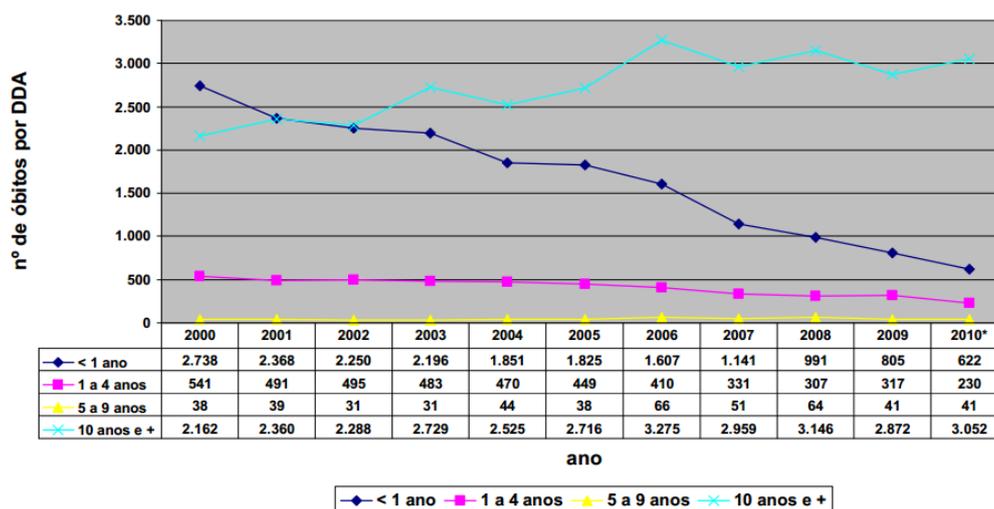


Gráfico 4 - Óbitos por DDA por faixa etária no Brasil. Nos últimos 10 anos observa-se a diminuição dos índices de mortalidade entre menores de 5 anos. Fonte: Portal da Saúde SUS, 2013.

Devido aos esforços mundiais pactuados entre diversas nações, inclusive o Brasil, para o combate à mortalidade infantil, houve redução das taxas de mortalidade infantil brasileiras para menores de 5 anos nas últimas décadas. Em 1990 eram contabilizados 59 óbitos de menores de 5 anos a cada mil nascidos vivos e em 2010 essa taxa passou a ser de 19 para cada mil brasileiros nascidos vivos (WHO/UNICEF, 2012).

A região Norte do país registrou aproximadamente 5 mil óbitos por causas evitáveis em 2006, números estes que tem declinado ligeiramente desde 2008 (gráfico 5). Em 2010 foram registrados 3.671 mortes infantis por causas evitáveis. No mesmo ano, 356 mortes ocorreram na região Norte devido às doenças diarreicas (Portal da Saúde SUS, 2013; DATASUS, 2013).

No ano de 2010 o Amazonas registrou 731 mortes infantis por causas evitáveis (gráfico 6) e a segunda maior notificação de mortes por DDA da região Norte, com 109 óbitos registrados, perdendo apenas para o Pará que registrou 160 mortes causadas pela diarreia no mesmo ano. No Amazonas foram contabilizados mais de 1.430.000 casos de DDA, com

1.445 óbitos registrados entre os anos de 2000 e 2011 (Portal da Saúde SUS, 2013; DATASUS, 2013).

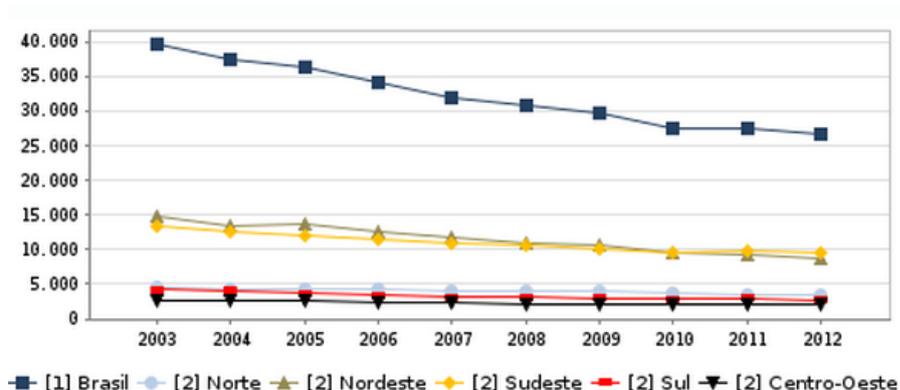


Gráfico 5 - Óbitos infantis por causas evitáveis notificados nas regiões brasileiras e os números nacionais. A região com menor índice de mortalidade infantil evitável é o Centro-oeste, e as regiões com os índices mais elevados são o Nordeste e o Sudeste. Fonte: DATASUS, 2013.

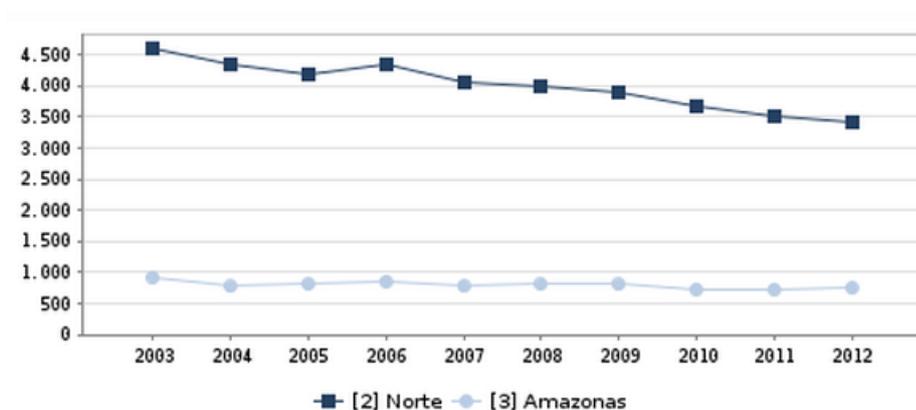


Gráfico 6 - Óbitos infantis por causas evitáveis no Estado do Amazonas e na região Norte do Brasil. Em 2010 foram registrados 731 óbitos infantis por causas evitáveis no Amazonas. Fonte: DATASUS, 2013.

De acordo com a definição disponível no Portal da Saúde do SUS, a doença diarreica aguda é uma síndrome caracterizada pelo aumento do número de evacuações, com fezes aquosas ou com perda de sua consistência, podendo haver em alguns casos presença de muco e sangue. Os episódios da doença diarreica podem ser classificados em dois grupos: diarreia aquosa, e diarreia sanguinolenta. A diarreia aquosa apresenta a perda de grande quantidade de água e evolução acelerada para um quadro de desidratação, enquanto que na diarreia sanguinolenta, ou disenteria, há presença de muco e/ou sangue sugerindo inflamação do intestino.

Febre, náuseas e dor abdominal são os sintomas frequentemente associados à DDA, sendo esta, em geral, autolimitada com tendência à cura espontânea, embora não confira imunidade duradoura. A duração varia de 2 a 14 dias e a gravidade depende da intensidade da desidratação e dos distúrbios eletrolíticos, principalmente em casos de desnutrição (Portal da Saúde SUS, 2012).

Os principais veículos de transmissão da DDA são a água e os alimentos contaminados pelos agentes infecciosos, sendo, portanto, uma doença associada aos hábitos de higiene pessoal de doentes sintomáticos ou assintomáticos. Homens, animais e alimentos são reservatórios dos patógenos causadores da diarreia, cuja transmissão se faz pela via fecal-oral de forma direta, principalmente pelas mãos, ou indireta, pelo contato com a superfície de objetos contaminados (MS, 2010).

A DDA pode ser de natureza infecciosa ou não infecciosa. A variedade de patógenos causadores da diarreia infecciosa inclui parasitas entéricos, bactérias e vírus (tabelas 1, 2 e 3). Os métodos de detecção dos agentes etiológicos da diarreia até a década de 70 eram restritos à identificação de bactérias e protozoários. Por esse motivo cerca de dois terços dos episódios diarreicos permaneciam sem definição etiológica (FARHAT, 1998). As primeiras investigações acerca do assunto, feitas por Ligh & Hodes em 1948, já indicavam a possível etiologia viral das gastroenterites.

Com o advento da Microscopia Eletrônica (ME) e de métodos precisos para detecção de antígenos virais e dos ácidos nucléicos ficou evidenciada a importância dos vírus na ocorrência de gastroenterites humanas, especialmente nos casos de diarreia infantil, assumindo estes um papel tão quanto ou mais importante que os demais patógenos relacionados (FARHAT, 1998).

AGENTE	GRUPO ETÁRIO DOS CASOS	CLÍNICA			PERÍODO DE INCUBAÇÃO	DURAÇÃO DA DOENÇA	MODO DE TRANSMISSÃO E PRINCIPAIS FONTES
		DIARREIA	FEBRE	ABDÔMEN			
<i>Balantidium coli</i>	Ignorado	Eventual com muco ou sangue	Rara	Dor	Ignorado	Ignorado	Fecal-oral, alimentos, água.
<i>Cryptosporidium</i>	Crianças e adultos com AIDS	Abundante e aquosa	Eventual	Câimbra eventual	1 a 2 semanas	4 dias a 3 semanas	Fecal-oral, alimentos, água, pessoa a pessoa, animais domésticos.

<i>Entamoeba histolytica</i>	Todos, principalmente adultos	Eventual com muco ou sangue	Variável	Cólica	1 a 2 semanas	Semanas e meses	Fecal-oral, alimentos, água.
<i>Giardia lamblia</i>	Todos principalmente crianças	Incoercíveis, fezes claras e gordurosas	Rara	Câimbras, distensão	5 a 25 dias	Semanas e anos	Fecal-oral, alimentos, água.
<i>Isopora belli</i>	Adultos com AIDS	Incoercível	Ignorado	Eventual	2 a 15 dias	2 a 3 semanas	Fecal-oral.

Tabela 1 – Parasitas entéricos, adaptado. Fonte: MMWR – Vol.39, RR.14 – 1990

AGENTE	GRUPO ETÁRIO DOS CASOS	CLÍNICA			PERÍODO DE INCUBAÇÃO	DURAÇÃO DA DOENÇA	MODO DE TRANSMISSÃO E PRINCIPAIS FONTES
		DIARREIA	FEBRE	VÔMITO			
<i>Bacillus cereus e S. aureus</i>	Todos	Geralmente pouco importante	Rara	Comum	1 a 6 horas	24 horas	Alimentos
<i>Campylobacter</i>	Todos	Pode ser disentérica	Variável	Variável	1 a 7 dias	1 dias a 4 semanas	Fecal-oral, alimentos, água, animais domésticos.
<i>E. coli enterooxigênica</i>	Todos	Aquosa, pode ser profusa	Variável	Eventual	12 horas a 3 dias	3 a 5 dias	Fecal-oral, alimentos, água, pessoa a pessoa.
<i>E. coli enteropatogênica</i>	Crianças	Aquosa, pode ser profusa	Variável	Variável	2 a 7 dias	1 a 3 semanas	Fecal-oral, alimentos, água, pessoa a pessoa.
<i>E. coli enteroenvasiva</i>	Adultos	Pode ser disentérica	Comum	Eventual	2 a 3 dias	1 a 2 semanas	Fecal-oral, alimentos, água, pessoa a pessoa.
<i>E. coli enterohemorrágica</i>	Todos	Inicia aquosa com sangue a seguir	Rara	Comum	3 a 4 dias	1 a 12 dias	Fecal-oral, alimentos, água, pessoa a pessoa.
<i>Salmonella não tifóide</i>	Todos, principalmente crianças	Pastosa, aquosa, as vezes com sangue	Comum	Eventual	8 horas a dois dias	5 a 7 dias	Fecal-oral, alimento e água.
<i>Shigella</i>	Todos, principalmente crianças	Pode ser disentérica	Comum	Eventual	1 a 7 dias	4 a 7 dias	Fecal-oral, alimentos, água, pessoa a pessoa
<i>Yersinia enterocolírica</i>	Todos	Mucosa, às vezes com sangue	Comum	Eventual	2 a 7 horas	1 dia a 3 semanas	Fecal-oral, alimentos, água, animais domésticos.
<i>Vibrio cholerae</i>	Todos principalmente adultos	Pode ser profusa e aquosa	Geralmente afebril	Comum	7 horas a 5 dias	3 a 5 dias	Fecal-oral, alimentos, água.

Tabela 2 – Bactérias entéricas. Fonte: MMWR – Vol.39, RR.14 - 1990

AGENTE	GRUPO ETÁRIO DOS CASOS	CLÍNICA		PERÍODO DE INCUBAÇÃO	DURAÇÃO DA DOENÇA	MODO DE TRANSMISSÃO E PRINCIPAIS FONTES
		FEBRE	VÔMITO			
Astrovírus	Crianças pequenas e idosos	Eventual	Eventual	1 a 6 horas	1 a 14 dias	Alimentos
Calicivírus	Crianças e adultos	Eventual	Comum em crianças	1 a 7 dias	1 a 3 dias	Fecal-oral, alimentos, água.
Adenovírus entérico	Crianças pequenas	Comum	Comum	12 horas a 3 dias	7 a 8 dias	Fecal-oral, alimentos, água, nosocomial.
Norovírus	Crianças maiores e adultos	Rara	Comum	2 a 7 dias	18 horas a 2 dias	Fecal-oral, alimentos, água, pessoa a pessoa.
Rotavírus Grupo A	Crianças pequenas	Comum	Comum	2 a 3 dias	5 a 7 dias	Fecal-oral, nosocomial, alimentos, água, pessoa a pessoa.
Rotavírus Grupo B	Crianças e adultos	Rara	Variável	3 a 4 dias	3 a 7 dias	Fecal-oral, água, pessoa a pessoa.
Rotavírus Grupo C	C	Ignorado	Ignorado	8 horas a dois dias	3 a 7 dias	Fecal-oral.

Tabela 3 – Vírus entéricos. Fonte: MMWR – Vol.39, RR.14 – 1990

Dentre os principais agentes etiológicos das gastroenterites humanas merece destaque o rotavírus, causador predominante de diarreia grave na infância (SALVADOR et al., 2011; VESIKARI, 2012; DUSSETY, 2013).

2.2 Rotavírus

2.2.1 Epidemiologia

O rotavírus é o principal agente etiológico da gastroenterite aguda grave na infância. Na década de 80 estudos epidemiológicos, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, revelaram que o rotavírus era o causador de 870 mil mortes anuais de crianças menores de cinco anos de idade em todo o mundo. Devido a vários fatores decorrentes de recentes esforços mundiais como a implementação da terapia da reidratação oral e a vacinação, este número foi significativamente reduzido para cerca de 450 mil mortes infantis anuais, o que, porém, não retirou do rotavírus a posição de principal microrganismo causador de morbimortalidade infantil em todo o mundo (VESIKARI et al, 2012).

Segundo Salvador et al., 2010, cerca de duas mil crianças morrem a cada dia, em decorrência da infecção por rotavírus. Estima-se que até 5 anos de idade, quase todas as crianças terão um episódio de gastroenterite causada pelo patógeno, 20% farão uma visita clínica, 1,5% serão hospitalizadas e aproximadamente 0,3% morrerão. Crianças residentes em países de baixa renda contabilizam 82% destas mortes. Atribui-se ao patógeno um caráter universal, uma vez que mais de 90% das crianças, independentemente da origem, tem anticorpos para o vírus. A infecção pelo patógeno ocorre especialmente entre 6 e 24 meses de idade, devido ao provável período de desmame. Nos recém-nascidos a forma assintomática predomina em virtude da transferência de anticorpos maternos durante a amamentação (BISHOP et al., 1996; ESTES & KAPIKIAN, 2007; DUSSETY et al, 2013)

Os rotavírus são patógenos de alta transmissibilidade, sendo excretado cerca de um trilhão de partículas virais por mL de fezes. De uma maneira geral, o padrão sazonal das infecções em países temperados estende-se do outono à primavera, enquanto que nos países tropicais ocorre ao longo de todo o ano (KAPIKIAN et al., 2001).

No Brasil, a estimativa de óbitos por doença diarreica causada por rotavírus, até o ano de inserção da vacina no calendário básico de vacinação em menores de cinco anos, era de 40% (CARMO, 2006). Em 2008, dois anos após a implementação da vacina contra o rotavírus no calendário nacional, de 1.128 mortes de menores de 5 anos, registradas por gastroenterite de origem infecciosa presumida, acredita-se que 451 mortes foram causadas por rotavírus (SALVADOR et al., 2011).

Um estudo realizado para avaliar dados epidemiológicos referentes à tendências de mortalidade na infância por diarreia entre os anos de 1995 e 2005 no Brasil, mostrou que apesar do número expressivo de óbitos e internações infantis naquele momento, era notória a tendência da queda da mortalidade infantil por doenças infecciosas intestinais, uma vez que medidas como a introdução da terapia da reidratação oral, diminuição da desnutrição infantil e melhora no acesso a serviços de saúde foram adotadas para impulsionar essa redução. Capitais da região Norte do país como Manaus, Belém, Boa Vista, Rio Branco, Porto Velho e Macapá apresentaram reduções no número de internações e/ou mortalidade infantil por diarreia neste período (LATORRE, 2010).

Na região Amazônica, no ano de 1977, Linhares foi pioneiro nas investigações acerca do rotavírus, ganhando com isso projeção em todo o Brasil. A partir de então deu-se início à busca pela avaliação do cenário epidemiológico deste patógeno no país. Estudos

demonstraram que Belém apresentava um percentual de 18,4% de casos de DDA decorrente de rotavírus (LINHARES, 1994). Em 2005, 20% das crianças com idade de até 5 anos residentes no estado do Acre apresentaram um quadro de diarreia aguda causada por rotavírus (SIQUEIRA et al, 2009). Em investigações realizadas entre os anos de 2000 e 2002 por Magalhães et al., no estado de Rondônia, foi observado um índice de 23% na ocorrência da diarreia causada por rotavírus em crianças hospitalizadas. Na cidade de Manaus, foi registrado um percentual de 25% de casos de rotavírus entre crianças avaliadas no período compreendido entre os anos de 2004 e 2006 (SANTOS, 2013). Portanto, os últimos estudos realizados na região Norte antes da implementação da vacina contra o rotavírus, indicaram um percentual que variou entre 18% e 25% dos casos de DDA na faixa etária infantil.

Quanto à sazonalidade do rotavírus no território nacional é observado um aumento na incidência do patógeno em meses mais frios ou no período de seca, entre maio e setembro nas regiões Centro-oeste e Sudeste. Nos estados do Norte e Nordeste, a ocorrência de rotavírus se distribui por todo o ano (CARMO, 2004).

2.2.2 Histórico

Os rotavírus (figura 2) foram descobertos por Bishop et al. (1973), na Austrália, durante um estudo com enfoque enzimático em secções da mucosa duodenal de crianças com diarreia. Ao observar os cortes histológicos em ME notou a presença de inúmeras partículas virais no interior de vesículas citoplasmáticas. Inicialmente as partículas virais foram denominadas Orbivírus por possuírem uma similaridade com um gênero anteriormente identificado. No mesmo ano Flewett et al., no Reino Unido, investigaram a associação destes patógenos à ocorrência de gastroenterite aguda na infância e, diferentemente de Bishop, detectaram tais agentes virais em extratos fecais diarreicos observados em ME utilizando a técnica do contraste negativo.

Devido à visualização da nítida dupla camada proteica e conformação estrutural passaram à denominação de Duovírus. Posteriormente foi sugerido que tais agentes virais originassem um novo gênero pertencente à família *Reoviridae*, por apresentarem semelhanças morfológicas com os demais membros desta, sendo por fim designados como Rotavírus, nome oriundo do latim *rota* por exibirem um formado de roda.

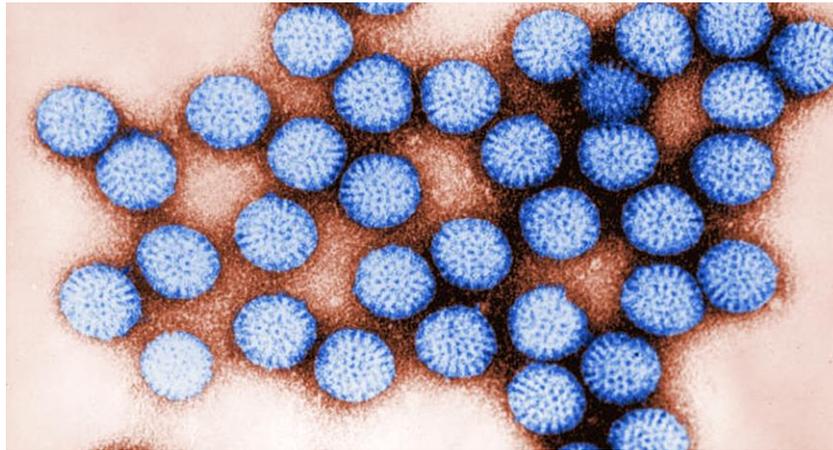


Figura 2 – Eletromicrografia de transmissão de partículas intactas de rotavírus com dupla camada. Fonte: *Centers for Diseases, Control and Prevention. Public Health Image Library, 1981.*

O primeiro registro do rotavírus no Brasil ocorreu em 1977 por Linhares et al., no estado do Pará, ao identificarem os patógenos em amostras diarreicas de crianças atendidas em um ambulatório público. A partir de então, uma série de investigações realizadas em todo o país, revelaram a importância destes agentes na etiologia das gastroenterites infantis.

A descoberta do rotavírus mediante o advento da ME em meados da década de 70 representou um importante avanço no esclarecimento da gênese da DDA, até então obscura em grande parte dos casos, o que revelou a importância do patógeno nesta doença infecciosa.

2.2.3 Classificação, Morfologia e Genoma Viral

Os rotavírus são um gênero de vírus entéricos pertencente à família *Reoviridae*. As partículas virais tem simetria icosaédrica, não envelopada, com medida aproximada de 75 nanômetros de diâmetro, sendo estes os únicos vírus conhecidos por possuírem o genoma composto por 11 segmentos de dsRNA. São constituídos por 6 proteínas estruturais VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7 e 5 proteínas não-estruturais NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, cada uma codificada por um dos segmentos do genoma (figura 3). Porém, em algumas cepas do grupo A foi detectada um segunda *open reading frame* (ORF) no segmento 11, levando à expressão de um novo produto proteico, a NSP6, em adição à NSP5. Em 2008, um sistema de

classificação do genoma completo foi desenvolvido para as cepas do rotavírus. Este sistema atribui um genótipo à cada um dos 11 segmentos do genoma, de acordo com os valores do cut-off do percentual de nucleotídeos estabelecido. Após esta classificação, os genes de rotavírus VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 são descritos usando-se a abreviação Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (x = número arábico começando por 1) respectivamente (DESSELBERGUER & GRAY, 2000; MATTHIJNSSENS et al., 2012).

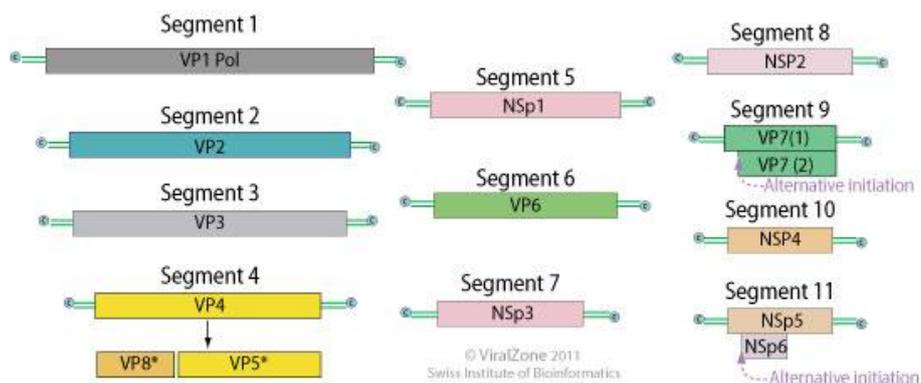


Figura 3 – Genoma dsRNA. Fonte: ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics, 2011.

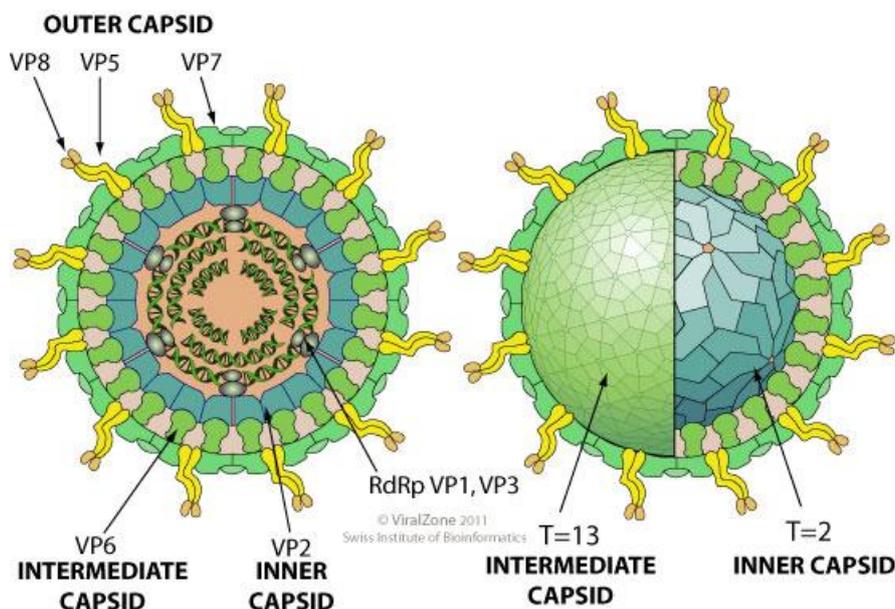


Figura 4 – Representação esquemática do rotavírus. Fonte: ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics, 2011.

As proteínas estruturais são componentes da tripla camada proteica que circunda o ácido ribonucleico: capsídeo interno (core), capsídeo intermediário e capsídeo externo

(figura 4). A camada interna, ou core, é composta pela proteína VP2, que recobre o genoma viral juntamente com as proteínas VP1 e VP3. A RdRp VP1 é uma RNA polimerase dependente de RNA que contém uma sequência de reconhecimento ao RNA viral. A VP2, uma RNA de ligação, constitui a estrutura do esqueleto do core viral, formado por 60 dímeros de proteína com 120 moléculas por vírion. A VP3 é uma guanililtransferase e metilase, envolvida na adição do 5-*cap* presente nos RNAs mensageiros virais. Essas proteínas apresentam, além destas, outras funções enzimáticas (ESTES & KAPIKIAN, 2007).

O capsídeo intermediário consiste em 260 trímeros da proteína VP6, detentora de determinantes de grupos e subgrupos específicos dos rotavírus. Com base na especificidade antigênica da VP6 os rotavírus são classificados em 8 grupos (A-H). Dentro do grupo A, são diferenciados os subgrupos I, II, I + II, não-I não-II de acordo com a reatividade da VP6 com dois anticorpos monoclonais. Os epítomos de reatividade cruzada estão em todas as proteínas estruturais e não estruturais, porém a VP6 é o grupo antigênico predominante por ser abundante e altamente imunogênico (ESTES & KAPIKIAN, 2007; MATTHIJNSSENS et al., 2012).

O capsídeo externo contém 260 trímeros da proteína VP7 e 60 dímeros da proteína VP4 com projeções acopladas tipo espículas. A VP4 interage com a VP6 e a VP7. Ambas proteínas do capsídeo externo induzem a formação de anticorpos neutralizantes correspondentes aos seus epítomos tipo-específicos e são responsáveis pela interação do vírus com o hospedeiro. A classificação dos rotavírus em sorotipos tem base nos epítomos neutralizáveis da glicoproteína VP7, chamada G, e da proteína sensível à protease VP4, denominada P, que gera um sistema de classificação binária. Os genótipos são determinados pelas técnicas de genotipagem e sequenciamento. Existem atualmente 27 genótipos e 15 sorotipos G, em que 11 são identificados em humanos. As cepas de rotavírus que infectam humanos encontradas até o momento são G1-6 e G8-12. Quanto a P há 15 sorotipos e, até o momento, 37 genótipos identificados cuja especificação é descrita entre colchetes, dentre os quais 12 foram detectados em humanos (ESTES & KAPIKIAN, 2007; MATTHIJNSSENS et al., 2008a; ABE et al., 2009).

A proteína VP4, além de determinar os sorotipos e genótipos P, tem sido relacionada a diferentes funções no ciclo replicativo do vírus, incluindo interação com a superfície da célula, internalização, hemaglutinação, neutralização e virulência (JAYARAM et al., 2004). Possui ainda um sítio de clivagem pela tripsina, produzindo dois fragmentos VP8 e VP5. A

clivagem proteolítica provavelmente estabiliza o conjunto de espículas, conferindo ordenamento icosaédrico, tendo como resultado uma potencialização da infectividade viral (ZARATE et al., 2000).

As proteínas não estruturais NSPs são sintetizadas durante a infecção e atuam na replicação ou patogênese viral. A NSP1 é uma proteína não estrutural de ligação à RNA. A NSP2 é uma proteína de ligação de RNA que se acumula no citoplasma e é necessária para a replicação do genoma. A NSP3 está ligado a RNAs mensageiros virais e é responsável pela paralisação da síntese de proteínas celulares. A NSP4 é uma enterotoxina viral que induz a diarreia, sendo esta a primeira enterotoxina viral descoberta. A NSP5 acumula-se no citoplasma juntamente com a NSP2, durante a infecção, e a NSP6 é uma proteína de ligação à ácido nucleico. Além disso, as NSPs assumem o papel da supressão da resposta imune do hospedeiro, com descrições mais detalhadas no tópico do ciclo de replicação viral, a seguir (EICHWALD et al., 2004; HYSER & ESTES, 2009; ARNOLDI & BURRONE, 2009; SHARMA, 2011).

2.2.4 Ciclo de Replicação Viral

O *virion* infeccioso do rotavírus é uma partícula não envelopada de tripla camada proteica (TLP), enquanto que a não infecciosa é denominada partícula de dupla camada (DLP). Há diferentes mecanismos que medeiam a entrada do rotavírus na célula hospedeira. Independentemente da via, na infecção viral completa a TLP interage com a superfície do enterócito por meio da proteína do capsídeo externo VP4 que é clivada por uma protease do lúmen intestinal, a tripsina, tendo como resultado a formação das subunidades proteicas VP5 e VP8 que interagem com receptores celulares e aumentam a infectividade viral (ZARATE et al., 2000; ARNOLDI & BURRONE, 2009).

Conforme a representação esquemática e descrição de Arnold e Burrone (2009) (figura 5), o virion perde o capsídeo externo tornando-se uma DLP transcricionalmente ativa, com a RdRp VP1 efetivamente ativa na síntese de fitas simples de RNA. Esses RNAs atuam como mRNAs para síntese das proteínas virais e como molde para os segmentos do genoma de dsRNA. Uma grande quantidade de proteínas é sintetizada e acumulada em corpos de inclusão citoplasmáticos denominados viroplasmas, considerados os sítios de replicação do genoma e montagem da progênie DLP. As proteínas virais identificadas nos viroplasmas são VP1-3, VP6 e as proteínas não estruturais NSP2 e NSP5.

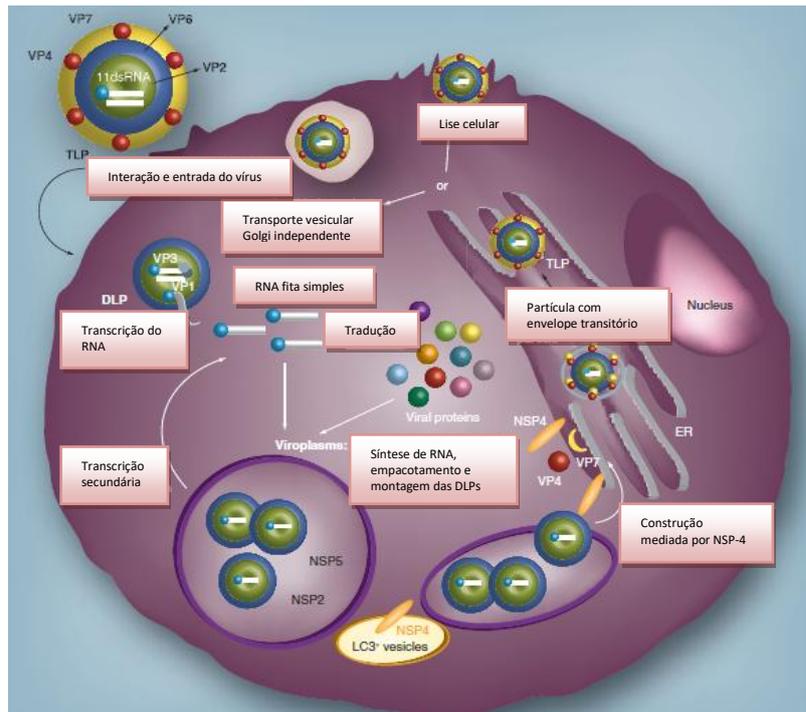


Figura 5 – Ciclo de replicação do rotavírus. Fonte: Arnoldi & Burrone, 2009, *Future virol. Future Science Group* (2009). Adaptado.

Há uma associação entre NSP5 e VP1 que sugere a participação direta daquela na função desta. A NSP3 é encontrada em todo o citoplasma durante a infecção viral e provavelmente esta associada ao citoesqueleto.

Após as etapas iniciais de formação do vírus, as DLPs brotam através da membrana do retículo endoplasmático, adquirindo um envelope transitório. Este brotamento é mediado pela proteína NSP4 que, em sua maioria, permanece dispersa no citoplasma, onde atua como receptor intracelular das DLPs recém-formadas e é orientada para o RE por uma sequência sinal (AU et al., 1989).

A proteína NSP4 foi descrita como uma proteína enterotoxigênica, responsável por induzir a elevação de fosfolipase – C dependente da concentração de cálcio intracelular de células hospedeiras da mucosa. Desta forma, a NSP4 aumenta a concentração de cálcio causando danos ao citoesqueleto e às junções intercelulares, o que aumenta a permeabilidade das células afetadas. Além disso, há a potencialização da liberação de íons cloreto por meio de uma via de sinalização de íon cálcio dependente, que causa a diarreia. Provavelmente a NSP4 é liberada a partir de enterócitos infectados no lúmen intestinal de forma solúvel, capaz de penetrar por difusão em células vizinhas por meio da interação desta com receptores celulares (DONG, 1997).

Com a internalização das DLPs no lúmen do RE, por um mecanismo desconhecido, o envelope transitório é removido e substituído pelas proteínas do capsídeo externo VP4 e VP7, formando, em fim, as partículas TLPs maduras. A liberação do vírus após a maturação pode ocorrer por diferentes meios: lise celular, observada em células MA104, ou transporte vesicular não convencional, em células Caco-2, sem a utilização dos aparatos do complexo de Golgi ou lisossomos, sendo, neste caso, liberado na superfície apical sem rompimento aparente da célula (ESPARZA et al., 1980; JOURDAN et al., 1997; LOPEZ et al., 2005).

2.2.5 Patogênese e Imunidade

O rotavírus infecta os enterócitos, células epiteliais presentes no íleo (figura 6) que apresentam uma estrutura de membrana denominada *brush-border membrane* (BBM) apical, responsável pela quebra de açúcares e peptídeos e transporte para os tecidos durante a digestão (JONES, 2006). A estrutura de tripla camada proteica confere proteção ao vírus, permitindo a sua resistência à ação de enzimas digestivas e do ácido presente no intestino.

Uma série de estudos desenvolvidos ao longo dos últimos anos têm trazido esclarecimentos acerca da patogênese do rotavírus, permitindo afirmar que diarreia causada por este patógeno resulta da má absorção pelos danos causados ao enterócito, da ativação do sistema nervoso entérico e da ação da NSP4 que altera a permeabilidade celular (BEAU et al., 2006; ANGEL et al., 2007; HYSER & ESTES, 2009).

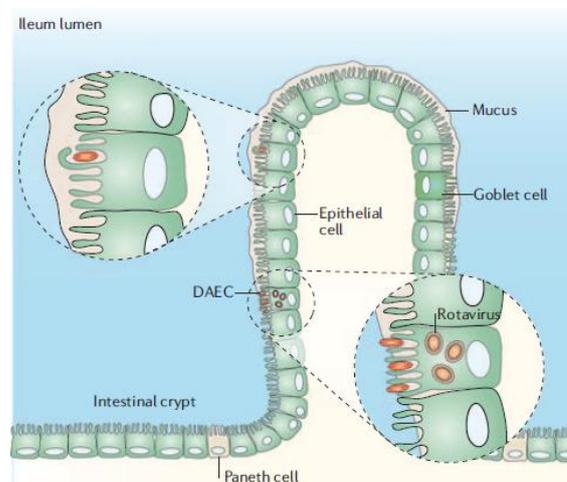


Figura 6 – Lúmen do íleo infectado por rotavírus.
Fonte: Jones, 2006, *Nature Review Microbiology* (2006)

Beau et al. (2006) ampliaram a compreensão dos danos causados às células epiteliais mediante a descoberta de que a infecção dos enterócitos pelo rotavírus ocasiona a diminuição da biossíntese da BBM, associada à hidrolase, o que provavelmente contribui para a má absorção intestinal.

Recentes achados têm revelado as estratégias usadas pelo rotavírus no curso da infecção. No entanto, mecanismos de patogênese e imunidade para o rotavírus ainda não são completamente conhecidos e variam de acordo com a espécie animal em estudo. O modelo de camundongos tem sido utilizado extensivamente para se investigar os componentes importantes do sistema imune na proteção do hospedeiro.

Os sintomas associados à infecção por rotavírus são geralmente evidenciados entre 3 e 24 meses de idade, período em que comumente ocorre a diarreia grave. Anticorpos contra o rotavírus, provenientes da mãe previamente infectada, atravessam a placenta e protegem o neonato. Isto explica as infecções assintomáticas encontradas nessas crianças. Após a primeira infecção natural, as crianças são protegidas de infecções sintomáticas subsequentes, independentemente se a primeira infecção foi sintomática ou assintomática (SHARMA, 2011).

Um hospedeiro normalmente responde a uma infecção viral por meio do desenvolvimento das respostas imune inata e adaptativa. A imunidade inata ocorre nos primeiros dias e desempenha um importante papel por um conjunto de mecanismos, incluindo a ativação de vias de sinalização pró-inflamatória e a produção de citocinas. As citocinas, incluindo as quimiocinas, realizam atividades pró e anti-inflamatórias e de proteção ao hospedeiro contra a infecção viral ou doença. A imunidade adaptativa surge lentamente e confere ao hospedeiro proteção da infecção viral por meio da ação de células T citotóxicas, anticorpos, e liberação de citocinas efetoras (JIANG et al., 2003).

Na infecção do rotavírus há a resposta imune humoral e celular que protege contra a reinfeção por diarreia grave, ainda que o reconhecimento da infecção na primeira semana da doença, antes do desenvolvimento completo de células T ou seleção e troca de classes de anticorpos, sugira a importância da imunidade inata na recuperação precoce da doença. A VP6 é o antígeno imunodominante na resposta de anticorpos humanos. Anticorpos IgA e IgG anti-VP6, testados por ensaios imunoenzimáticos, são indicadores da imunidade ao rotavírus. O alto nível de anticorpo IgA no soro está correlacionado com a proteção clínica à infecção por rotavírus. Anticorpos neutralizantes contra a VP7 e VP4 claramente

desempenham um papel importante na infecção natural, porém este papel não é bem compreendido quando se trata de imunidade induzida por vacina (JIANG et al., 2003; SHARMA, 2011).

A descrição a seguir, acerca da patogênese e imunidade do rotavírus, esta baseada na observação em roedores, de acordo com Angel et al. (2007). Anticorpos neutralizantes dirigidos contra VP4 e/ou VP7 podem impedir a penetração do vírus no enterócito (figura 7). Quando esta etapa falha o vírus internalizado inicia o processo de replicação que causa alteração no metabolismo das proteínas de membrana, ocasionando a má absorção ou diarreia osmótica. Além disso, o rotavírus eleva a concentração de cálcio intracelular que rompe o citoesqueleto e as junções da célula, aumentando a permeabilidade celular. A partir de então, a replicação viral pode ser inibida pela secreção da imunoglobulina A anti-VP6, que realiza a transcitose através do enterócito. Por um mecanismo desconhecido, em que a proteína enterotoxigênica NSP4 está envolvida, o rotavírus estimula o sistema nervoso entérico induzindo a diarreia secretora e aumentando a motilidade intestinal, por se tratar de um vírus citopático. A infecção por rotavírus apresenta uma fase de viremia, por esse motivo antígenos, dsRNA e partículas infecciosas do rotavírus também têm sido encontradas no sangue de crianças.

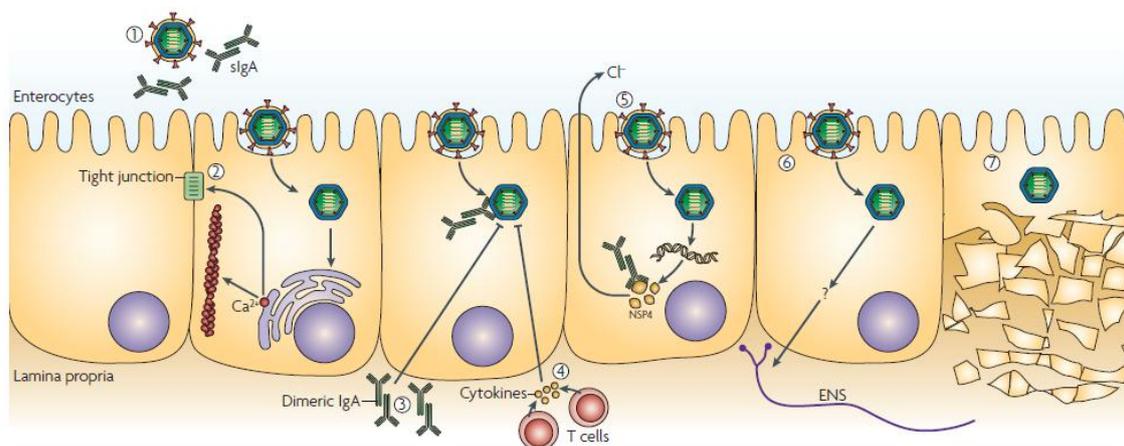


Figura 7 - Esquema dos mecanismos de patogênese viral e imunidade.
Fonte: Angel et al., *Nature Review Microbiology* (2007)

Estudos em animais ampliaram o conhecimento acerca da imunidade humana para o rotavírus. Angel et al., 2007, afirmam que em camundongos adultos infectados com rotavírus homólogo murino, as células TCD8+ tem função na resolução da infecção primária, e as TCD4+ desempenham um papel importante, mas não essencial na geração de IgA

intestinal, que é o principal efetor para proteção a longo prazo. Devido à infecção por rotavírus incluir uma fase de viremia, células B intestinais e sistêmicas são observadas em camundongos. Entretanto, estudos têm demonstrado que apenas as células plasmáticas que residem no intestino tem um efeito antiviral, indicando que os anticorpos da mucosa fornecem proteção e não os anticorpos sistêmicos, neste modelo.

Angel et al., 2007, afirmam ainda que em concordância com estudos realizados em animais, os níveis de IgA específicos para rotavírus no soro de crianças infectadas naturalmente são semelhantes aos níveis de IgA intestinal e alguns estudos indicam que os níveis de IgA no soro fornecem uma boa correlação de proteção. Além disso, as respostas de células T para rotavírus estão relacionadas com o desenvolvimento de anticorpos de proteção. O anticorpo IgA persiste após a infecção natural por pelo menos 6 meses. Tem sido encontrado mais IgA preexistente específico para rotavírus do que IgG no soro de crianças infectadas com sintomas atenuados. As proteínas VP2, VP4 e VP6 são os polipeptídeos imunodominantes reconhecidos por anticorpos IgG. Portanto, o desenvolvimento dos anticorpos IgA e IgG são indicativos de proteção à infecção subsequente. Em camundongos adultos experimentalmente infectados com rotavírus, as proteínas VP4 e VP6 foram descritas como as mais imunogênicas tanto em soro como em fezes (COLOMINA et al., 1998).

Estudos da resposta de células T humanas para rotavírus mostram que tanto adultos saudáveis quanto infectados com rotavírus tem baixas frequências de TCD4+ e TCD8+ específicos que secretam interferon (IFN)- γ , mas não interleucina (IL)-13 ou IL-4. Em crianças com gastroenterite o número dessas células é baixo ou indetectável. Com isso, o padrão de citocinas secretadas por TCD4+ não é bem definido, porém um padrão sugerido é a atuação conjunta de T_H1 e T_H2, como foi encontrado em investigações realizadas em porcos neonatos (ANGEL et al., 2007).

Alguns estudos têm demonstrado elevados níveis das citocinas, IFN- α , IFN- γ , IL10 e TNF- α no soro ou plasma de crianças com diarreia causada por rotavírus (JIANG et al, 2003). Contudo pouco se sabe a respeito da função desempenhada por essas citocinas na patogênese do rotavírus ou na imunidade para a doença.

A infecção por RV em camundongos deficientes de células B funcionais e linfócitos T frequentemente resulta em infecção crônica, sugerindo a importância da resposta imune adaptativa na defesa do hospedeiro para este patógeno. Entretanto, conforme Frias et al.

2010, estudos tem evidenciado igualmente a importância do papel da imunidade inata no controle da infecção por RV. As células do epitélio intestinal (IECs) podem ser as mediadoras da resposta inata, uma vez que são predominantes marcadores da infecção por RV. O papel das IECs é provavelmente independente da diarreia induzida por RV. De acordo com dados referentes à resposta do hospedeiro às infecções virais em geral, acredita-se que o Interferon tipo 1 contribui para a resposta imune inata mediadora da depuração do RV (FRIAS et al., 2010).

2.2.6 Epidemiologia das cepas virais

Os rotavírus pertencentes ao grupo A possuem uma importância epidemiológica por serem os principais causadores de gastroenterite humana, responsáveis pela maioria dos casos graves da doença em crianças menores de dois anos. Os grupos B-G estão mais envolvidos com acometimento de aves e suínos, embora tenham sido registrados casos de diarreia humana ocasionados por rotavírus dos grupos B e C (MARTÍNEZ, 2007).

A epidemiologia das cepas do rotavírus é bastante complexa por caracterizar-se pela variabilidade genética expressa em seus múltiplos sorotipos. A cepa G1P[8] tem sido encontrada com maior frequência na América do Norte, Europa e Austrália do que na América do Sul, Ásia e África nos últimos 30 anos. Em algumas regiões da Índia, Brasil e África as combinações G9P[6] G5 e G8, respectivamente, têm sido mais frequentes que em outros lugares do mundo. A possível explicação para isso é a ocorrência de reagrupamento entre cepas de rotavírus humanos e animais (ANGEL et al, 2007).

Diversos estudos realizados até os anos 90 mostraram a predominância dos genótipos G1-G4, porém novas cepas têm emergido em todo o mundo. O reagrupamento de genótipos incomuns do rotavírus nunca antes detectados tem sido cada vez mais frequente. Em Bangladesh, no ano de 2005, e posteriormente no sul da Índia, em 2007, foi encontrada a combinação G11P[25] e ainda G3P[3] (RAHMAN et al., 2005; BANERGEE et al., 2007). Na Itália genótipos incomuns P[10] e P[11], na África do Sul e na Arábia Saudita P[6] e G12P[8], respectivamente, são outros achados que tem demonstrado o surgimento desses novos rearranjos de rotavírus que infectam humanos (KHEYAMI et al., 2008; DONNO et al., 2009; SEHERI et al., 2010).

Segundo Gentsch et al., 2005, os genótipos de rotavírus descritos como os de maior circulação mundial foram G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8]. Este último tem sido classificado como o atual genótipo emergente em todo o mundo.

2.2.7 Vacina

Intervenções específicas para o combate ao rotavírus, como o uso de vacinas, são estratégias perspicazes de prevenção deste sério problema de saúde pública. Em 2006, os resultados dos ensaios clínicos principais de duas vacinas RotaTeq (Merck) e Rotarix (GlaxoSmithKline Biological GSK Rixensart, Bélgica) mostraram alta eficácia, 85% a 98%, na prevenção da diarreia na forma grave causada por rotavírus. Além disso, outro importante resultado foi que nenhuma vacina apresentou problemas colaterais de intussuscepção intestinal, situação ocorrida na primeira vacina disponibilizada contra o rotavírus, a RotaShield (Wielth Laderle), que foi retirada de circulação. Um programa de vacinação eficaz contra o rotavírus precisa levar em consideração a variação geográfica e prevalência das cepas. A WHO mantém um importante sistema de vigilância regional para monitorar a segurança e eficácia das vacinas e as variações dos sorotipos (SHARMA, 2011; PATEL et al., 2011).

A vacina do rotavírus reagrupado humano-bovino RotaTeq é uma vacina oral, pentavalente, viva-atenuada composta por cinco estirpes de rotavírus reagrupados. Quatro rotavírus reagrupados expressam a proteína VP7 de origem humana (G1, G2, G3, G4) ligados à proteína (P7[5]) da estirpe WC3 bovino. O quinto reagrupamento é proteína P[8] de uma cepa de rotavírus humano ligada à proteína G6 de rotavírus de origem bovina. A RotaTeq é administrada em três doses orais com 1 a 2 meses de intervalo, iniciando entre 6 e 12 semanas de idade (SHARMA, 2011).

A Rotarix®, vacina viva-atenuada de rotavírus humano denominada monovalente, contém a estirpe RIX4414, originalmente isolada de uma criança infectada com rotavírus de estirpe designada 89-12. Esta vacina é uma cepa G1P[8], selecionada por representar o antígeno VP7 e VP4 mais comum dos rotavírus humanos. Crianças infectadas com cepas semelhantes desenvolvem ampla reação cruzada na resposta de anticorpos neutralizantes. Portanto essa vacina foi produzida para conter uma única cepa, com base no pressuposto que a primeira infecção por rotavírus impossibilita a segunda infecção na forma grave. Esta

vacina é administrada em duas doses, a primeira aos 2 meses e a segunda aos 4 meses de idade (SHARMA, 2011).

Antes do licenciamento das atuais vacinas, a incidência de intussuscepção intestinal em crianças após a administração da dose da primeira vacina licenciada para o combate ao rotavírus humano, a RotaShield, foi o resultado de um ensaio mal sucedido que culminou com a suspensão desta devido aos efeitos colaterais que apresentaram em número relevante de casos. Porém, as vacinas desenvolvidas e atualmente autorizadas têm mostrado resultados satisfatórios na profilaxia da DDA causada pelo rotavírus (ANGEL et al., 2007; PATEL et al., 2011).

O Brasil foi o primeiro país do mundo a introduzir no programa nacional de imunização a vacina oral de rotavírus humano (VORH), licenciada no mercado com o nome Rotarix®. Com isso, obteve grande avanço no aspecto do controle e prevenção do rotavírus ao inclui-la a partir de março de 2006, no calendário básico de vacinação. Estimativas mundiais apontam que na América latina, a vacinação efetiva resultará no abatimento de 60% ou mais, na taxa de mortalidade infantil nos próximos anos. No Brasil, a proteção conferida pela vacina para todas as diarreias causadas por rotavírus é de 70%. Nos casos mais graves, esse percentual sobe para 86% a 98%, e para hospitalização por diarreia varia de 80% a 95%. O esquema vacinal da VORH é composta por duas doses, a primeira aos 2 meses e a segunda aos 4 meses de idade, sendo estes critérios rigorosamente seguidos para a eficácia do efeito profilático (SALVADOR et al., 2011).

Após a introdução da VORH, houve um expressivo declínio no número de casos de DDA relacionados ao rotavírus e inclusive de outras formas de diarreia em países industrializados e de renda média. Países latino americanos como o México e o Brasil apresentaram declínio de 35% e 22% respectivamente, nas taxas de mortalidade relacionadas à DDA na idade de 5 anos (PATEL et al., 2011).

3 JUSTIFICATIVA

A Amazônia representa cerca de 60% do território brasileiro, abrangendo os Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Rondônia, Roraima, Mato Grosso, Pará e Tocantins, e o Oeste do Maranhão. A floresta tropical apresenta-se como um ecossistema extremamente complexo e delicado. O solo, fauna, flora e microbiota encontram-se estreitamente relacionados, de tal modo que a condição de um dos elementos afeta diretamente os outros. A identificação precisa de agentes etiológicos resulta ser o principal marcador epidemiológico necessário para que os responsáveis pela saúde pública possam realizar uma vigilância epidemiológica moderna e assim adotem medidas precisas e oportunas, tendentes ao bloqueio de surtos destes patógenos. Da mesma forma, este conhecimento orientará as ações a serem adotadas para controlar as fontes de infecção e interromper as principais vias de transmissão. Neste âmbito encontramos a diarreia infecciosa, a qual permanece como uma das principais causas de morbimortalidade infantil. Dentre a variedade de patógenos envolvidos na gênese das gastroenterites humanas merece destaque o rotavírus, o mais importante agente etiológico da diarreia na infância. As rotaviroses causam um impacto na saúde pública, principalmente de países que estão em desenvolvimento. Devido à importância médica que o rotavírus representa mundialmente, a vacina é uma estratégia crucial para o controle e prevenção da diarreia na infância. Porém, existem diferentes hospedeiros e múltiplos genótipos e sorotipos de rotavírus que circulam mundialmente e que sofrem constantes variações. Uma vez que a cobertura vacinal é restrita a determinadas cepas, previamente descritas como aquelas de maior circulação entre humanos, tornam-se necessárias constantes investigações das características gênicas do rotavírus que podem emergir ou persistir apesar da vacina. A vigilância epidemiológica e laboratorial de caracterização molecular dos genes que codificam para as VPs e NSPs são fundamentais para a avaliação da vacina e do aparecimento de novos genótipos. Além disto, revelam a possível emergência de variantes ou sub-linhagens genotípicas que escapam à imunização, contribuindo para o entendimento da epidemiologia do rotavírus na região.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Realizar detecção e caracterização gênica de rotavírus de amostras diarreicas de crianças atendidas em hospitais da cidade de Manaus, Amazonas entre os anos de 2007 e 2008.

4.2 Objetivos específicos

- Detectar rotavírus em amostras fecais de crianças entre 0 e 10 anos, com diagnóstico de gastroenterite;
- Identificar os eletroferotipos e características epidemiológicas correlacionadas dos rotavírus;
- Identificar os genótipos virais G e P circulantes em Manaus, através de RT-PCR;
- Realizar análise genética dos genes que codificam as proteínas estruturais do core VP1, VP2, VP3; e não-estruturais NSP3 e NSP5, de rotavírus do grupo A.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta das amostras

No período compreendido entre abril de 2007 e março de 2008 foram coletadas semanalmente amostras fecais de crianças com idade de 0 a 10 anos que apresentaram um quadro de diarreia, totalizando 1.337 amostras fecais. A coleta foi realizada em três hospitais da cidade de Manaus que atendem a população infantil local, a saber, o Hospital e Pronto-Socorro da Criança (HSPC) situado na zona sul de Manaus, o HSPC da zona leste da cidade e o HSPC situado na zona oeste.

As amostras de fezes foram coletadas por evacuação espontânea, acondicionadas em recipientes e conduzidas ao Laboratório de Biodiversidade da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Leônidas e Maria Deane, onde foram armazenadas *in natura* a -80°C. As amostras diarreicas foram devidamente etiquetadas com a numeração, nome do hospital e data da coleta e posteriormente armazenadas.

5.2 Critérios de inclusão das amostras

Para a seleção das amostras fecais coletadas, foi estabelecida como diarreia aguda a mudança abrupta do hábito intestinal, caracterizada pela eliminação de três ou mais evacuações líquidas ou amolecidas, por um período de 24 horas, com duração máxima de três dias a uma semana de etiologia presumivelmente infecciosa. Não se considerou como portadoras de diarreia aguda crianças que apresentaram alteração do hábito intestinal, em consequência de emprego de medicamentos, por exemplo, antibióticos e sais de ferro, ou que apresentem outros distúrbios do tubo digestivo, por exemplo, a síndrome do cólon irritável.

Ficou estabelecido como critério para diarreia persistente a eliminação de três ou mais evacuações líquidas ou amolecidas por dia, com duração superior a quatorze dias e originada a partir de um episódio de diarreia aguda, de etiologia presumivelmente infecciosa. Considerou-se como febre, temperatura axilar acima de 37,8°C, quando verificada no momento da avaliação clínica ou quando referida pela mãe. A desidratação foi

diagnosticada pelo profissional médico responsável. A presença ou ausência de vômito foi relatada pelo responsável pela avaliação clínica.

5.3 Entrevista

Foi preenchido um questionário epidemiológico para cada participante. O acompanhante responsável pela criança foi inicialmente esclarecido a respeito da pesquisa e convidado a colaborar com o aceite no Termo de Consentimento Livre-Esclarecido (Apêndice B) e o preenchimento da Ficha de Dados Clínicos (Apêndice C).

5.4 Comitê de Ética em Pesquisa

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal do Amazonas. O CEP consultado aprovou o presente projeto sob o parecer de número 266/2006 (Anexo A).

5.5 Preparo da suspensão fecal

Para o preparo da suspensão as amostras fecais foram diluídas a 10% em tampão Tris-Ca⁺ 0,01M, pH 7,2, homogeneizadas e centrifugadas a 8000 rpm por 15 minutos a temperatura 4C°. O sobrenadante foi coletado e estocado a temperatura -80C°.

5.6 Extração do genoma viral

A extração de RNA do vírus em estudo foi realizada pelo método TRIzol – fabricante Invitrogen, de acordo com o protocolo adaptado de Chomczynski et al. (1987). Este método é baseado na utilização de solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina.

Em um microtubo eppendorf de 1,5 mL são homegeneizados em vortex 300µL da suspensão fecal com 750µL do reagente TRIzol[®], e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adiciona-se 200µL de clorofórmio para novamente ser agitado em vortex e centrifugado a 14.000 rotações por minuto (rpm), temperatura em 4C° durante 15

minutos. O sobrenadante deve ser transferido para outro tubo de 1,5mL, sem retirar a interface, e o RNA é precipitado com 500µL de isopropanol e 30µL da solução acetato de sódio a 0,3M, pH 5,0. Após, faz-se uma nova centrifugação a 12.000 rpm, a temperatura 4Cº por 10 minutos. Despreza-se o sobrenadante. Ao ser precipitado, adiciona-se 500µL de etanol a 75% gelado e a amostra é centrifugada por mais 5 minutos a 12.00 rpm, a temperatura 4Cº. Remove-se o etanol com cuidado para que o RNA não escorra e o tubo deve ser invertido em papel absorvente por aproximadamente 20 minutos à temperatura ambiente para eliminar resquícios do etanol. Por fim ressuspende-se o RNA em 30µL de água DNase/RNase free para ser estocado à temperatura -80Cº.

5.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

O RNA extraído foi submetido ao PAGE para triagem das amostras positivas e para visualização dos perfis eletroforéticos do rotavírus. O método utilizado foi baseado no protocolo de Pereira et al (1983). As moléculas de RNA, de carga negativa, migram pela ação de uma corrente elétrica para o pólo oposto através de um suporte de gel apoiado entre placas de vidro. O gel é constituído de dois polímeros, a acrilamida 7,5% e a bisacrilamida 2%, em presença de dois catalizadores, o persulfato de amônio 10% e o tetrametilenodiamina (TEMED) . Quanto maior a molécula mais lenta a migração através dos poros do gel de poliacrilamida, o que possibilita a separação das mesmas.

Esta técnica permite a visualização dos segmentos de dsRNA do rotavírus. Os rotavírus pertencentes ao grupo A são divididos em quatro categorias de segmentos: quatro segmentos grandes, dois segmentos de tamanho médio, três segmentos pequenos e outros dois segmentos ainda menores. Os rotavírus do mesmo grupo dispõem ainda de dois eletroferotipos: longo e curto. Dentre as vantagens do método PAGE está a possibilidade de visualizar prontamente a diferença entre os padrões do genoma do rotavírus do grupo A em relação aos grupos incomuns em humanos, B e C (ESTES & KAPIKIAN, 2007).

O RNA extraído é homogeneizado com o tampão de amostra, que o impede de flutuar e permite visualizar o andamento da corrida, e aplicado sobre as canaletas do gel, que estará imerso em tampão de corrida Tris/glicina (Tris a 0,025M/ glicina a 0,109M pH 8,2), na cuba de eletroforese a 100V. A duração da corrida deverá ser de 2 a 3 horas. Ao

término da corrida o gel deve ser imerso em cinco soluções e passar por uma lavagem com água ultra pura para a visualização das bandas do genoma viral (tabela 3).

Soluções	Tempo
Solução fixadora	20 minutos
Solução corante nitrato de prata (1x)	20 minutos
Lavagem em água ultra pura	3x
Solução Reveladora	3 minutos
Ácido acético P.A. a 5%	1 minuto
Etanol P.A. a 10%	Permanente

Tabela 4 – Soluções para visualização das bandas em gel de poliacrilamida.

5.8 Caracterização gênica do rotavírus (RT-PCR e Nested-PCR)

5.8.1 Iniciadores dos genes VP4 e VP7

Para as etapas de RT-PCR e Nested-PCR utiliza-se os iniciadores consensuais desenvolvidos por Gentsch et al. (1992) 4con2/4con3 (P) que amplificam o fragmento do gene VP4 (tabela 4), bem como os iniciadores consensuais desenvolvidos por Das et al. (1994) 9con1/9con2 (G), que amplificam o fragmento do gene VP7 (tabela 5). Os iniciadores específicos para a identificação dos genótipos do rotavírus em Nested-PCR para os genótipos P estão ilustrados na figura 14, enquanto que os genótipos G podem ser visualizados na figura 15.

Primers	Sequência 5'-3'	Posição
4 Con3	TGGCTTCGCTCATTATAGACA	11-32
4 Con2	ATTCGGACCATTATAACC	868-887
1T-1	TCTACTTGGATAACGTGC	339-356
2T-1	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	474-494
3T-1	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	259-278
4T-1	TGAGACATGCAATTGGAC	385-402
5T-1	ATCATAGTTAGTAGTCGC	575-594

Tabela 5 – Pool de iniciadores para definição do genótipo P do gene VP4. Fonte: Gentsch et al., 1992.

Primers	Sequência 5'-3'	Posição
9 Con2	TAGCTCCTTTT7AATGTATGG;	37-56
9T1-1	TCTTGCAAAGCAAATAATG;	176-195
9T1-2	GTFIAGAAATGAYTTCTCCACT;	262-281
9T-3P	GTCCAGTTIGCAGTGTTAGC;	484-503
9T-4	GGGTCGATGGAAAATTCT;	423-440
9T-9B	TATAAAGTCCATFGCAC.	131-147

Tabela 6 – Pool de iniciadores para definição do genótipo G do gene VP7. Fonte: Das et al., 1994.

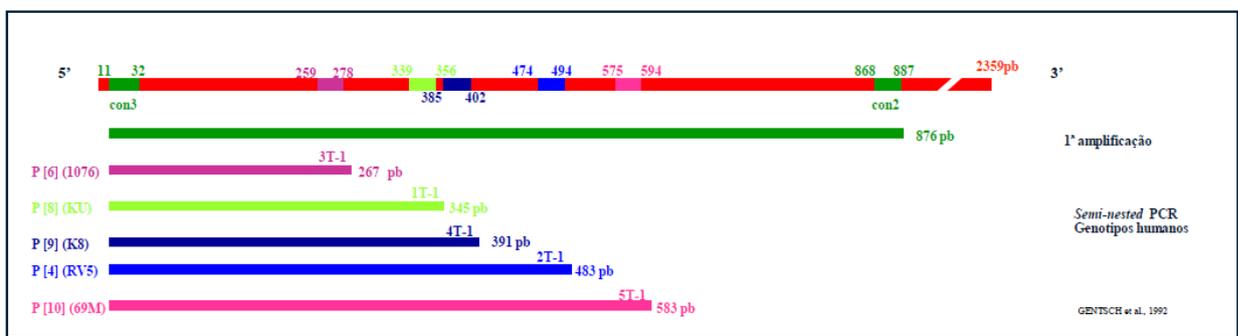


Figura 8 – Ilustração esquemática dos genótipos de VP4. Fonte: Gentsch et al., 1992.

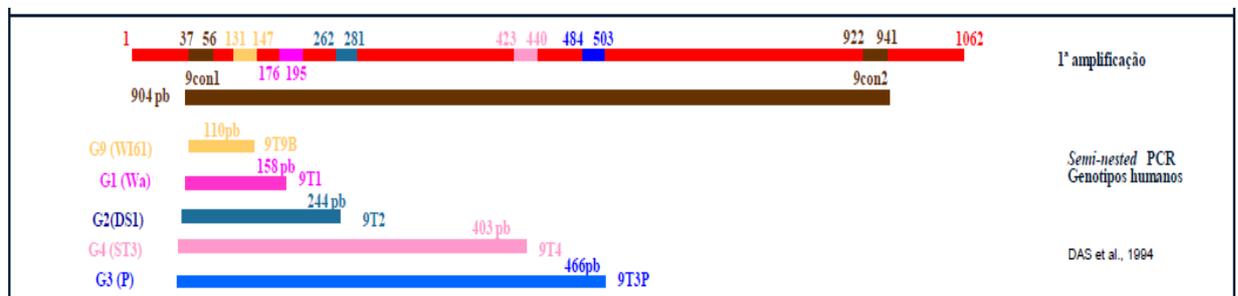


Figura 9 – Ilustração esquemática dos genótipos de VP7. Fonte: Das et al., 1994.

5.8.2 RT-PCR VP4 e VP7

O protocolo da Reação em Cadeia pela Polimerase precedida da Transcrição Reversa foi cedido pela equipe da Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas, Belém-PA, e constitui-se de duas etapas descritas a seguir.

Na primeira etapa realiza-se a transcrição reversa, a partir das fitas de RNA, para a síntese do DNA complementar. Em um microtubo de 0,2mL adiciona-se 5µL do RNA extraído em 0,5µL da mistura de iniciadores consensuais 9con1/9con2 (G) ou 4con2/4con3 (P). A amostra é desnaturada a 94Cº por 5 minutos e imediatamente posta em banho de gelo por 5 minutos. Em seguida, adiciona-se ao microtubo 7µL da mistura de reagentes descritos na tabela 6, e o tubo deve ser incubado à temperatura de 42Cº por 1 hora.

Reagentes	Concentração
H ₂ O DNase/RNase free	-
dNTPs	2,5mM
Tampão	10x
MgCl ₂	50mM
RT Superscript II TM	200U/µL

Tabela 7 – Reagentes utilizados na transcrição reversa para confecção do cDNA.

Para a PCR adiciona-se à reação do cDNA a mistura dos reagentes descritos na tabela 7. O tubo é posto em termociclador, para a amplificação que consiste em um ciclo inicial de desnaturação de 94Cº por 5 minutos, 40 ciclos posteriores de desnaturação a 94ºC por 1 minuto, anelamento a 50Cº por 30 segundos e extensão a 72Cº por 30 segundos, e um ciclo de extensão final de 72Cº por 10 minutos, mantendo, por fim, a temperatura de 4Cº.

Reagentes	Concentração
H ₂ O DNase/RNase free	-
dNTPs	2,5mM
Tampão	10x
Taq polimerase	200U/µL

Tabela 8 - Reagentes utilizados para a PCR dos genes VP4 e VP7.

5.8.3 Nested-PCR

Após a RT-PCR realiza-se a segunda etapa do protocolo para a caracterização dos genótipos de rotavírus em Nested-PCR. Para isto, em um microtubo de 0,2mL adiciona-se 2µL do produto da RT-PCR em 23µL da mistura dos reagentes (tabela 8), incluindo nesta etapa o *pool* de iniciadores específicos para a identificação dos genótipos G1, G2, G3, G4, G5, G8, G9 e G10, com o iniciador consensual 9con1, e o *pool* de iniciadores dos genótipos P[4], P[6], P[8] e P[9], com o iniciador consensual 4con3. O microtubo deve então ser posto em termociclador programado com o mesmo ciclo de desnaturação, hibridização e extensão da reação anterior.

Reagentes	Concentração
H ₂ O DNase/RNase free	-
DNTP	2,5mM
Tampão	10x
MgCl ₂	50mM
Iniciador consensual	10µM
<i>Pool</i> (P ou G)	10µM
Taq polimerase	200U/µL

Tabela 9 – Reagentes para realização do Nested-PCR.

Após amplificação dos genes, os produtos do Nested-PCR, com todo o seu volume, são homogeneizados com tampão de corrida e aplicados sobre as canaletas do gel de agarose vertical a 1,5% , a 100 Volts durante aproximadamente 20 minutos. Em seguida é feita a imersão em solução reveladora de brometo de etídio diluído, por 10 minutos. Por fim, as bandas amplificadas podem ser visualizadas por meio de um equipamento transluminador com luz UV.

5.8.4 Iniciadores dos genes VP1, VP2, VP3, NSP3 e NSP5

Para a realização da RT-PCR foram utilizados os iniciadores de para a amplificação dos genes que codificam as proteínas VP1, VP2 e VP3 feitos por Varghese et al. (2006) (tabela 9).

Para a amplificação dos genes de NSP3 e NSP5 foram utilizados os primers desenhados por Matthijnsens et al. (2006) (tabela 10).

<i>Primers</i>	<i>Sequência 5' - 3'</i>	<i>Posição</i>
VP1F	GGCTATTAAGCTGTACAATGGG	1–23
VP1IR	TAATCCTCATGAGAAAACACTGAC	686–663
VP2F	GGCTATTAAGGCTCAATGGCG	1–22
VP2IR	CTTCATCTTGAAATATAGCATCAC	686–663
VP3F	GGCTATTAAGCAGTACCAGTAG	1–23
VP3IR	GTAACATAGATTCATTACGCGGACC	702–677

Tabela 10 – Iniciadores para a amplificação dos genes VP1, VP2, VP3. Fonte: Varghese et al. (2006).

<i>Primers</i>	<i>Sequência 5' - 3'</i>
GEN-NSP3F	GGCTTTTAATGCTTTTCAGTG
GEN-NSP3R	ACATAACGCCCTATAGC
GEN-NSP5F	GGCTTTTAAGCGCTACAG
GEN-NSP5R	GGTCACAAAACGGGAGT

Tabela 11 – Iniciadores para amplificação dos gene NSP3, NSP5. Fonte: Matthijnsens et al. (2006).

5.8.5 RT-PCR VP1, 2, 3 NSP3 e 5

Este protocolo da Reação em Cadeia pela Polimerase precedida da Transcrição Reversa constitui-se de duas etapas descritas a seguir.

Na primeira etapa realiza-se a transcrição reversa, a partir das fitas de RNA, para a síntese do DNA complementar. Em um microtubo de 0,2mL adiciona-se 5µL do RNA extraído em 0,5µL da mistura de iniciadores consensuais correspondentes a cada gene. A amostra é desnaturada a 94Cº por 5 minutos e imediatamente posta em banho de gelo por 5 minutos. Em seguida, adiciona-se ao microtubo 7µL da mistura de reagentes descritos na tabela 2, e o tubo deve ser incubado à temperatura de 42Cº por 1 hora.

A amplificação parcial dos genes NSP3 e NSP5 foi realizada segundo a descrição de Matthijnsens et al. (2006) e para a amplificação dos genes VP1, VP2 e VP3 foi utilizado o

protocolo de Varghese et al. (2006). Para a PCR adiciona-se à reação do cDNA a mistura dos reagentes descritos no quadro 3. O tubo é posto em termociclador, para a amplificação que consiste em um ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 5 minutos, 40 ciclos posteriores de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e um ciclo de extensão final de 72°C por 10 minutos, mantendo, por fim, a temperatura de 4°C.

Após amplificação dos genes, os produtos da PCR são visualizados após corrida e gel de agarose 1,5% a 100 Volts.

5.8.6 Sequenciamento dos amplicons e análise filogenética

Os produtos da PCR dos genes VP1, VP2, VP3, NSP3 e NSP5 foram purificados através do QIAquick PCR purification kit® (Qiagen, CA, USA) e enviados para a Plataforma de Sequenciamento de DNA genômico RPT01B CPqGM/ Fiocruz, Bahia.

Os cromatogramas dos arquivos do sequenciamento foram analisados por meio do programa Chromas Lite (Technelysium, Queensland, Austrália) (figura 16). As pesquisas das seqüências de nucleotídios de genes de rotavírus humano, utilizadas como referência para a edição das amostras sequenciadas, foram realizadas por meio do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) USA, servidor *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), na base de dados do GeneBank. As seqüências *forward* e *reverse* dos genes amplificados foram alinhadas para a construção das seqüências consenso de cada amostra. Os alinhamentos destas seqüências foram realizados no programa ClustalX2 1.81.

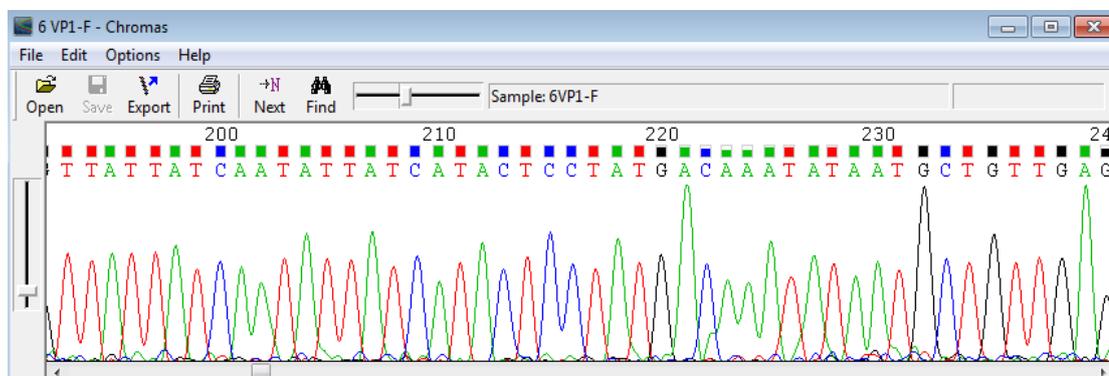


Figura 10 – Ilustração da análise dos picos dos sequenciamentos realizada no programa Chromas Lite.

Após obtenção das sequências consenso foi realizada a edição manual das mesmas utilizando-se o programa editor de alinhamento GeneDoc, versão 2.6.002. Durante a edição foi realizada a análise dos cromatogramas para verificação da qualidade dos picos correspondentes aos nucleotídeos.

Concluídas as edições, foram selecionadas sequências correspondentes de genes de rotavírus que infectam ovinos, suínos, felinos, símios, equinos e humanos. Selecionou-se para cada gene estudado uma sequência gênica desta pesquisa e uma sequência referência com maior distinção em sua sequência de nucleotídeos, com a finalidade de efetuar a visualização dos aminoácidos correspondentes à proteína e assim realizar um novo alinhamento e edição de todas as sequências para ajustar a posição correta das trincas de códons. A sequência de nucleotídeos e aminoácidos destes segmentos foram obtidos no GeneBank, analisados no Expsy Translate Tool, Bioinformatics Resource Portal (<http://web.expasy.org/translate/>), alinhados no ClustalX e editados no GenDoc.

Após a obtenção das sequências alinhadas, as relações filogenéticas entre as cepas foram construídas utilizando-se o conjunto de programas PHYLIP versão 3.69.

Os dendrogramas foram construídos utilizando-se o método neighbor-joining (SAITOU & NEI, 1987) e o Kimura *two parameter model* (1980). A reprodutibilidade das sequências foi calculada pelo valor de *bootstrap* de 100 replicações. O valor limiar do *bootstrap* foi estabelecido acima de 50%. As sequências consenso que continham nucleotídeos exatos em percentual inferior a 98% não foram incluídos na análise filogenética.

6 RESULTADOS

6.1 Amostragem e percentual de infecção por rotavírus do grupo A

Foram coletadas 1.337 amostras diarreicas de crianças com até 10 anos de idade ao longo dos meses de julho de 2007 a dezembro de 2008 (gráfico 7). A coleta foi realizada em três dos principais hospitais e prontos-socorros públicos da criança da cidade de Manaus.

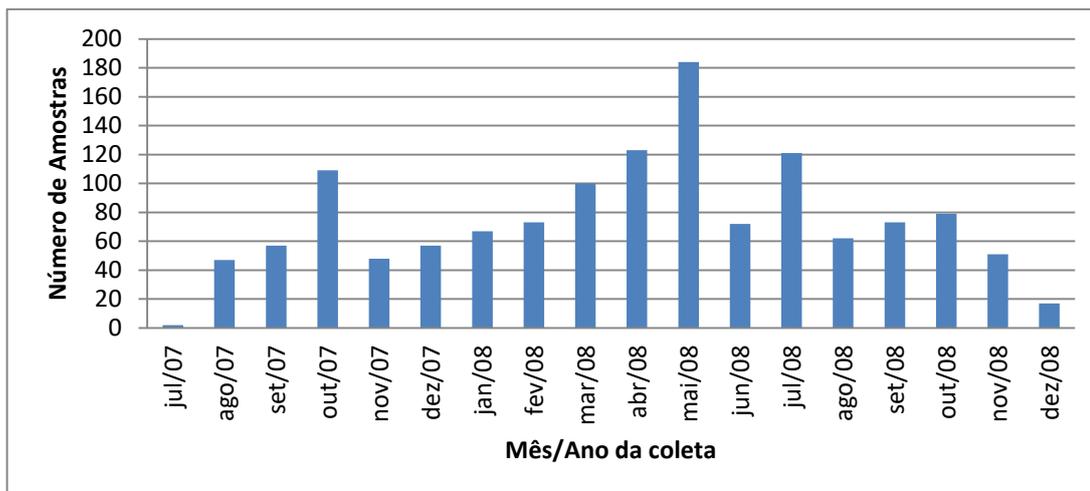


Gráfico 7 – Distribuição das amostras coletadas ao longo dos anos de 2007 e 2008 em três hospitais e prontos-socorros da criança na cidade de Manaus.

Foram realizados testes de aglutinação em látex/fita imunocromatográfica, para detecção de rotavírus do grupo A que revelaram 213 amostras positivas. Desde então as amostras estiveram armazenadas *in natura* à temperatura -80C^0 no prédio da Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Deane, Amazonas.

A partir do ano de 2011, todas as amostras diarreicas foram novamente triadas por meio da extração do genoma viral e eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para detecção de rotavírus e identificação de seu perfil eletroforético. Foram detectadas 73 amostras positivas para RV, distribuídas entre os meses da coleta (gráfico 8).

O PAGE revelou apenas 35 dentre as 213 amostras previamente positivas para RV na primeira triagem. Supõe-se que as amostras identificadas nos testes preliminares e não reveladas em PAGE foram detectadas com vestígios de proteínas virais provavelmente no final do decurso da infecção, onde as partículas virais já estariam com baixa carga, o que impossibilitou a visualização dos eletroferotipos.

Dentre as demais amostras negativas para o rotavírus nos testes preliminares, foram identificadas 38 amostras RV positivas em PAGE. Supõe-se que estas apresentaram a carga viral abaixo do nível detectável pela sensibilidade dos testes, o que resultou em falsos negativos. Além disso, os testes realizados detectavam apenas rotavírus pertencentes ao grupo A, o mais prevalente em humanos, diferentemente do PAGE que pode revelar eletroferotipos de RV pertencentes aos demais grupos virais B-G.

Observou-se que, entre as 73 amostras detectadas em PAGE, houve prevalência de perfis eletroforéticos curtos, sem perfis aparentes de rotavírus atípicos (Figura 11).

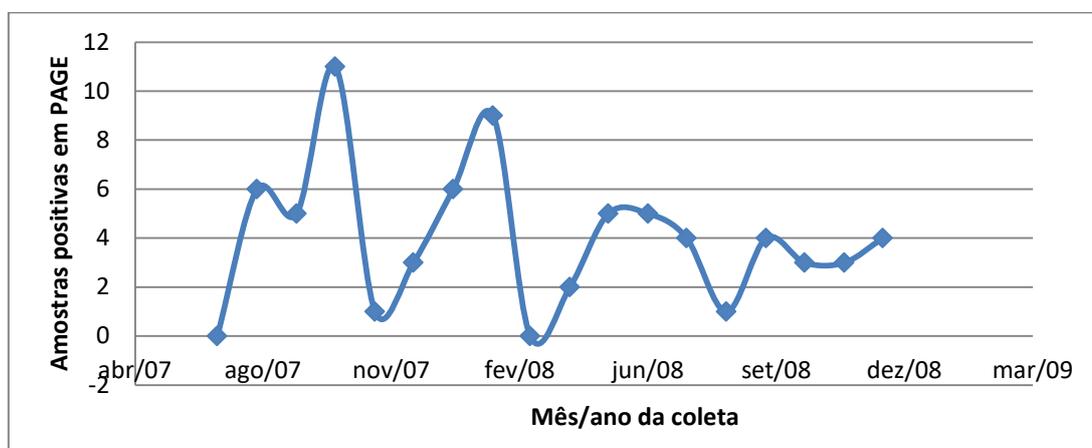


Gráfico 8 – Distribuição das amostras positivas para rotavírus detectadas em PAGE, encontradas ao longo dos meses de julho de 2007 a dezembro de 2008.

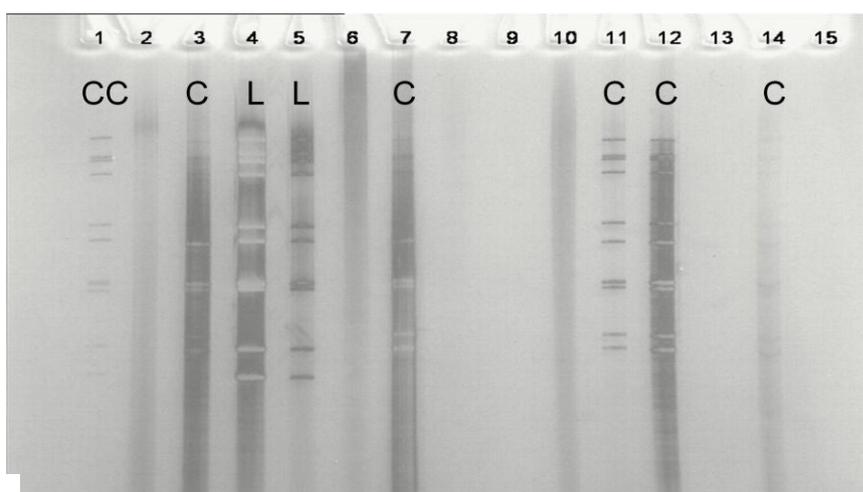


Figura 11 – Perfis eletroforéticos de amostras positivas para rotavírus, visualizados em gel de eletroforese. CC: controle curto, C: curto, L: longo.

6.2 Sazonalidade dos casos de gastroenterite e rotavirose

Picos mais elevados de casos de diarreia de origem diversa foram observados nos meses de agosto a outubro de 2007 e março a maio de 2008, com um pico elevado também em julho de 2008, na cidade de Manaus.

Ao todo, foram detectadas 251 amostras positivas para rotavírus no decorrer deste estudo o que correspondeu a 18,7% dos casos investigados. Houve maior número de registros de amostras positivas para rotavírus entre os meses de agosto a outubro de 2007, semelhantemente ao que foi registrado no mesmo período de 2008, este, porém, apresentando ligeiro declínio quando comparado ao ano anterior (gráfico 9).

Conforme o gráfico 9, embora tenham sido delineados alguns picos mais elevados, observou-se uma distribuição quase uniforme dos casos de DDA causada por rotavírus.

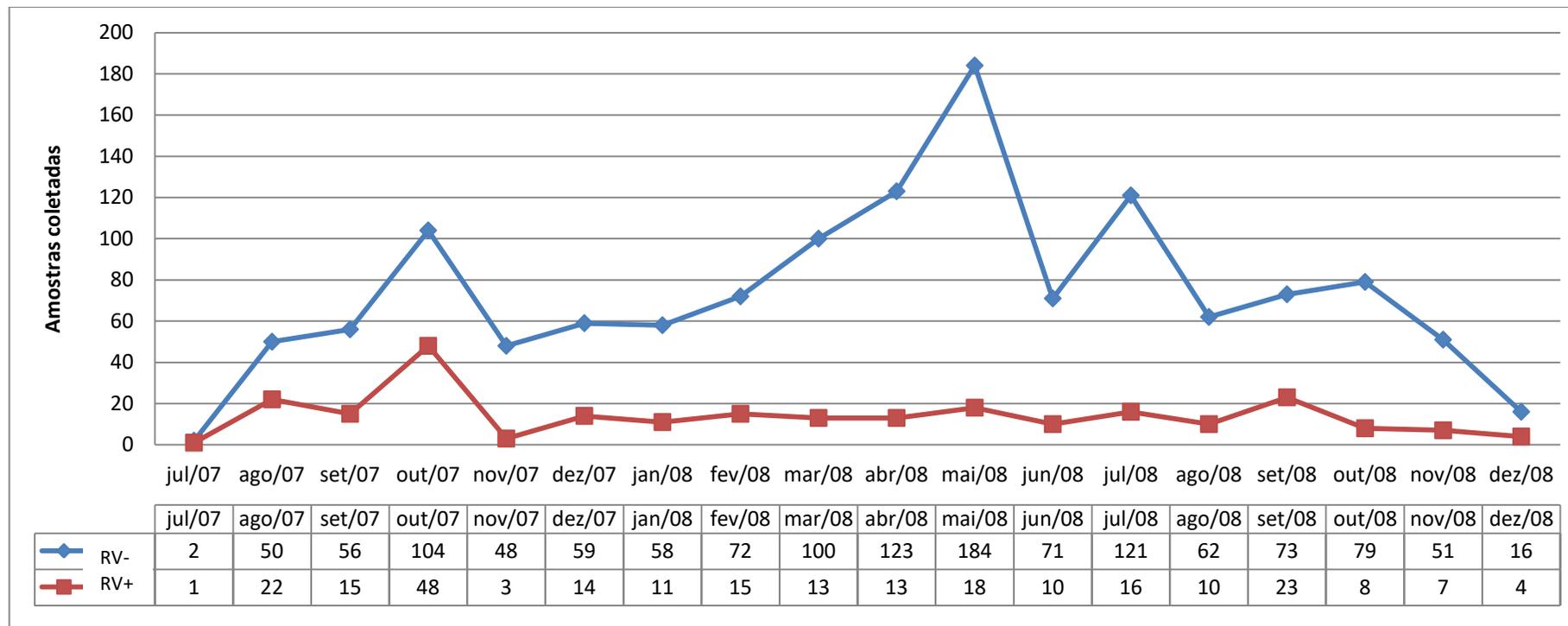


Gráfico 9 – Comparação entre o número de amostras diarreicas coletadas e o número correspondente do total de amostras rotavírus positivas, fazendo referência a cada mês do período da coleta.

A maioria dos casos de diarreia detectados ao longo desta pesquisa foram crianças do sexo masculino. Este apresentou maior percentual de positividade para o rotavírus, totalizando 58% das infecções (gráfico 10).

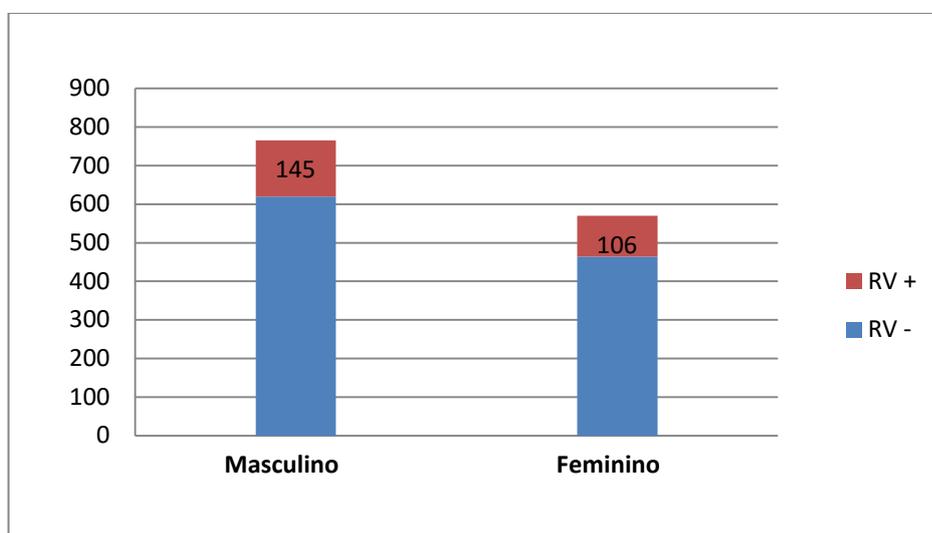


Gráfico 10 – Positividade para rotavírus indicando predominância da ocorrência dos casos no sexo masculino.

Comparando as diferentes faixas etárias em relação às amostras rotavírus positivas em PAGE houve predominância de infecções na idade de 0-24 meses, com maior ocorrência entre crianças com até 1 ano de idade, correspondendo a 38% dos casos investigados. Em seguida, a idade entre 1 e 2 anos correspondeu a 36% das rotaviroses, e na idade de 2 a 3 anos 12% dos casos de DDA causada pelo patógeno (gráfico 11).

Com relação ao período de amamentação das crianças infectadas com rotavírus, crianças que amamentaram entre o 1º e o 12º mês de vida corresponderam a 55% dos episódios (gráfico 12). Observou-se que quanto maior o período de amamentação da criança, menor a porcentagem de casos de infecção por rotavírus, o que reforça a importância da prática do aleitamento materno para a imunidade do bebê.

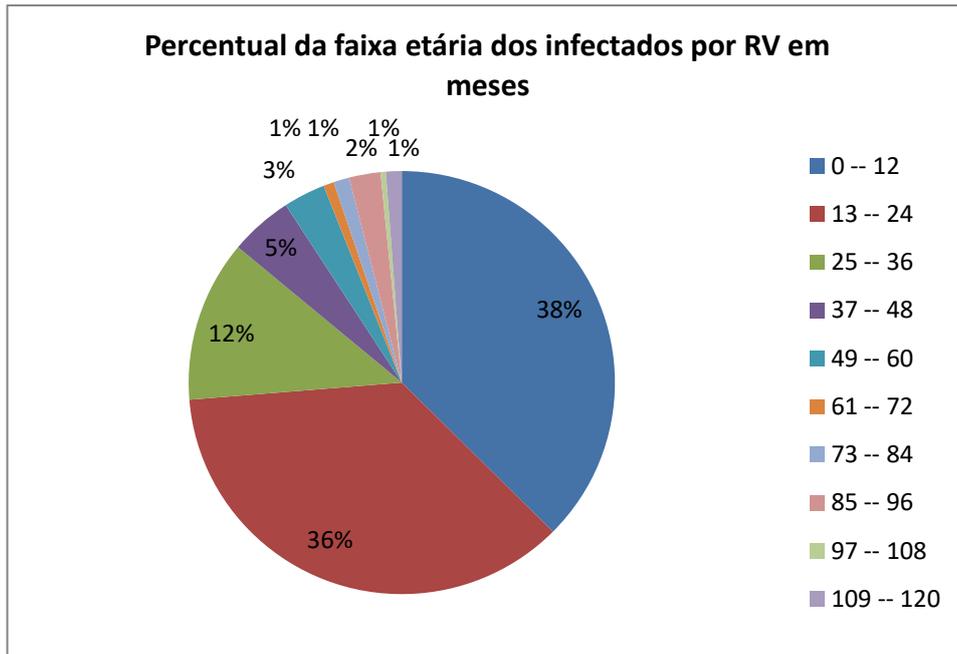


Gráfico 11 – Distribuição das amostras positivas para o rotavírus conforme a idade em meses. Crianças de 0 a 24 meses representam 74% das infecções investigadas.

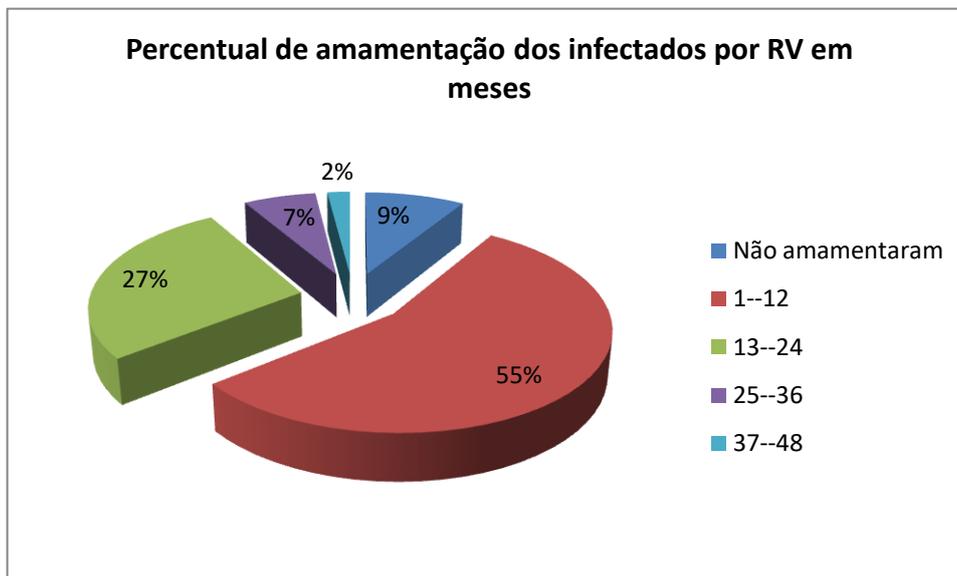


Gráfico 12 – Percentual das amostras RV positivas de acordo com o período de amamentação. Crianças que deixaram de ser amamentadas a partir de 1 mês até um ano de idade representaram 53% dos casos de positividade para RV.

As amostras diarreicas foram coletadas em diferentes zonas da cidade de Manaus. Houve predominância dos casos de gastroenterite na zona sul da cidade, com mais de 600 amostras obtidas em 18 meses de coleta, dentre as quais foram encontradas 143 das 251 amostras positivas para rotavírus detectadas neste estudo (gráfico 13).

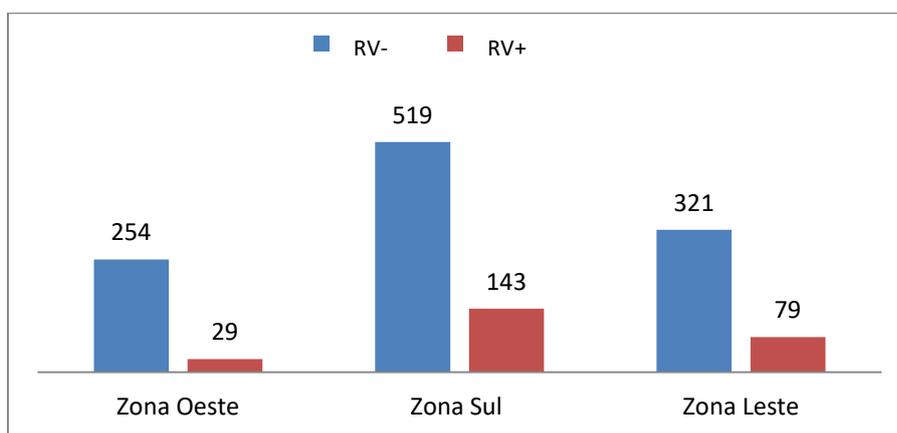


Gráfico 13 – Distribuição das amostras diarreicas positivas para rotavírus por zonas da cidade de Manaus.

A duração da diarreia variou de 1 a 15 dias. O maior tempo de durações diarreicas variou entre 1 e 5 dias de infecção viral (tabela 12).

Duração da gastroenterite em dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	14	15
Número de casos	77	45	36	35	19	7	6	6	4	4	2	5	5

Tabela 12 – Número de casos de gastroenterite causada por rotavírus e sua duração em dias.

A contaminação parental por RV foi observada em 23,2% dos casos. Esta contaminação deve-se provavelmente aos hábitos de higienização familiar.

Um significativo número de infecções por rotavírus foi identificado em famílias cuja origem da água utilizada para consumo provinha de poços artesianos, como pode ser observado no gráfico 14.

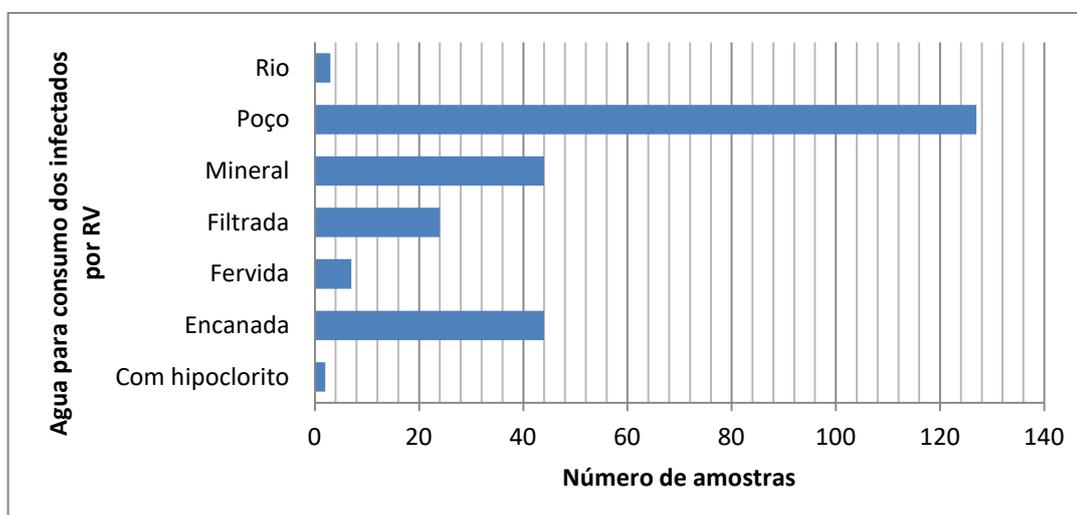


Gráfico 14 – Distribuição dos casos RV positivos de acordo com a origem da água para consumo.

Foram avaliados os principais sinais e sintomas associados à infecção por rotavírus. De acordo com o Portal da Saúde do SUS (2013), a febre, náuseas, a dor abdominal e quadros de desidratação são os sintomas mais comuns, associados à diarreia. Dentre as amostras investigadas observou-se um padrão esperado de sintomas, porém com relatos reduzidos de quadros de desidratação e com uma característica incomum para a rotavirose de presença de sangue visível nas fezes de 29 crianças infectadas com o rotavírus (gráfico 15).

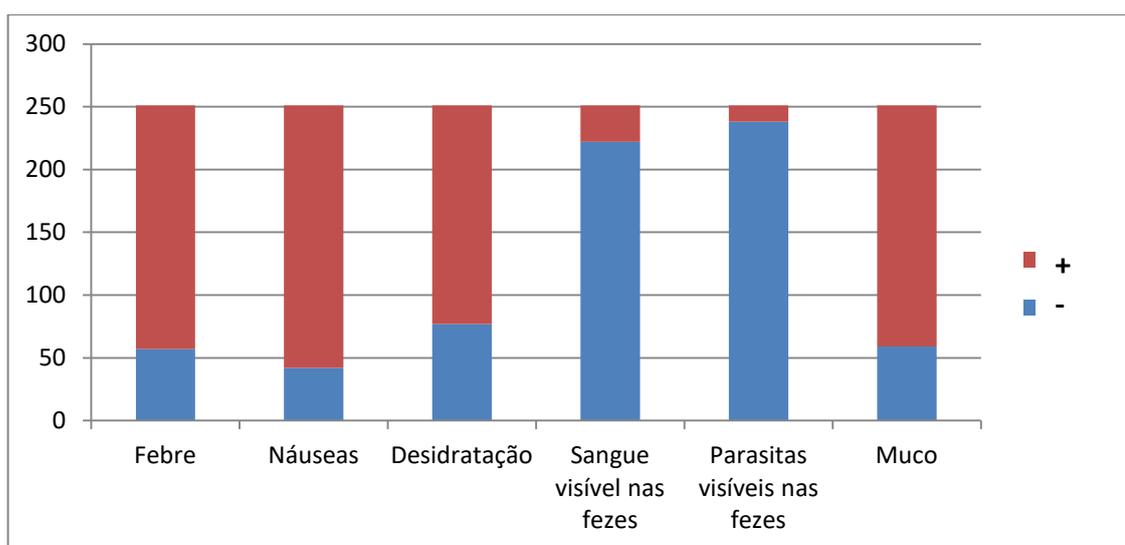


Gráfico 15 – Sinais e sintomas associados aos casos de diarreia causada por rotavírus.

Dentre as 251 amostras positivas para o rotavírus, foram observadas 13 amostras que apresentaram parasitas visíveis, dentre as quais 6 tiveram característica de sangue visível nas fezes.

6.3 Caracterização dos genótipos virais circulantes em Manaus

Foram identificados os 73 genótipos virais, dentre as amostras detectadas em PAGE, através das reações em cadeia pela polimerase precedida da transcrição reversa (RT-PCR e Nested) (figura 12). O genótipo viral G2P[4] apresentou predominância, tendo sido determinado em 68 amostras, o que equivale a 93% dos casos diarreicos investigados, causados pelo patógeno (gráfico 16). Apenas 1 amostra foi identificada com o genótipo G2P[9] e 6% das amostras corresponderam ao genótipo P[4] cujos genótipos G não foram tipados.

Dentre os genótipos G identificados neste estudo, 95% são G2 e 5% não foram tipados. Os genótipos P apresentaram prevalência do tipo P[4], com apenas uma amostra diferenciada, com o genótipo P[9] (gráfico 17).

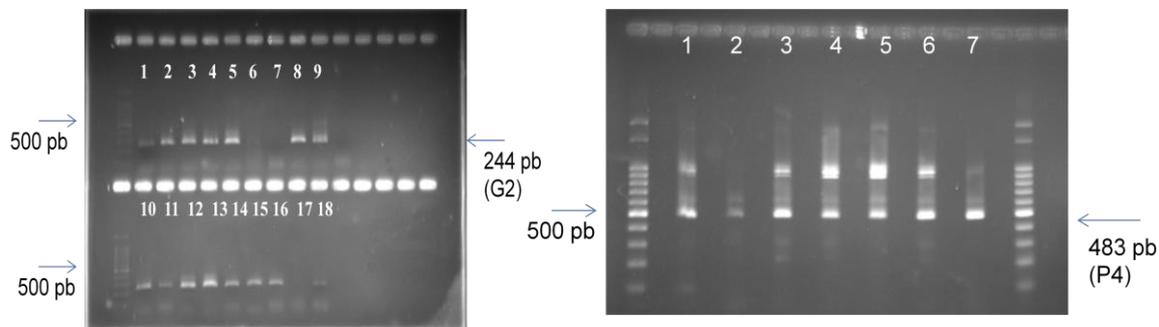


Figura 12 – Gel de agarose 1%, mostrando produtos da amplificação por RT-PCR dos genes VP7 com 244pb, característico de G2 e VP4 com 483pb típico de P4, respectivamente, com os marcadores de peso molecular de 100pb (Ludwing Biotec).

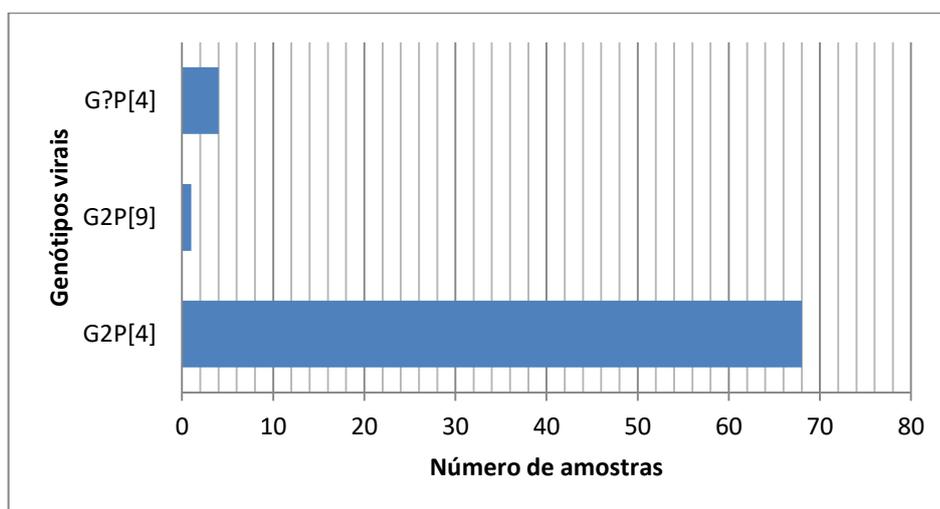


Gráfico 16 – Número de amostras correspondentes aos genótipos de rotavírus determinados nas 73 amostras positivas. Houve predominância do genótipo G2P[4].

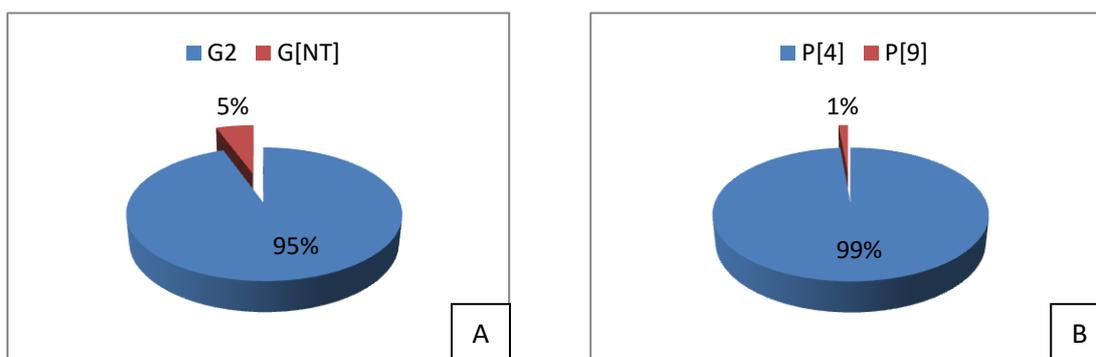


Gráfico 17 – Porcentagem de detecção dos genótipos G, gráfico A, e genótipo P, gráfico B, de rotavírus identificados nas 73 amostras analisadas. G[NT] – genótipo G não tipado.

6.4 Vacina do rotavírus

Não consta nas informações das coletas de dados os dados referentes à vacina do rotavírus. No entanto, com base no pressuposto que as crianças brasileiras estão sendo imunizadas desde o ano 2006, ano de implementação da VORH, 55 das 73 amostras detectadas de crianças com idade de até 2 anos nesta pesquisa eram elegíveis à vacina, destas 51 G2P[4], 3 G[NT]P4 e 1 G2P[9] (tabela 13).

Idade em meses	Ano da coleta	Genótipo	Eletroferotipo
1	2007	G2P[4]	Curto
1	2007	G2P[4]	Curto
1	2007	G2P[4]	Curto
2	2007	G2P[4]	Curto
2	2007	G2P[4]	Curto
2	2007	G2P[4]	Curto
3	2007	G2P[4]	Curto
6	2007	G2P[4]	Curto
7	2007	G2P[4]	Curto
9	2007	G2P[4]	Curto
10	2007	G2P[4]	Curto
10	2007	G[NT]P[4]	Longo
10	2007	G[NT]P[4]	Longo
10	2007	G2P[9]	Curto
11	2007	G2P[4]	Curto
11	2007	G2P[4]	Curto
12	2007	G2P[4]	Curto
14	2007	G2P[4]	Curto
19	2007	G2P[4]	Curto
20	2007	G2P[4]	Curto
20	2007	G2P[4]	Curto
3	2008	G2P[4]	Curto
3	2008	G2P[4]	Curto
3	2008	G2P[4]	Curto
3	2008	G2P[4]	Curto
4	2008	G2P[4]	Curto
4	2008	G2P[4]	Curto
6	2008	G2P[4]	Curto
6	2008	G2P[4]	Curto
8	2008	G2P[4]	Curto
8	2008	G2P[4]	Curto
9	2008	G2P[4]	Curto
10	2008	G2P[4]	Curto
10	2008	G2P[4]	Curto
12	2008	G2P[4]	Curto

12	2008	G2P[4]	Curto
13	2008	G2P[4]	Curto
13	2008	G2P[4]	Curto
13	2008	G2P[4]	Curto
13	2008	G2P[4]	Curto
13	2008	G2P[4]	Curto
14	2008	G2P[4]	Curto
14	2008	G2P[4]	Curto
17	2008	G2P[4]	Curto
17	2008	G[NT]P[4]	Longo
18	2008	G2P[4]	Curto
18	2008	G2P[4]	Curto
18	2008	G2P[4]	Curto
19	2008	G2P[4]	Curto
19	2008	G2P[4]	Curto
20	2008	G2P[4]	Curto
20	2008	G2P[4]	Curto
21	2008	G2P[4]	Curto
22	2008	G2P[4]	Curto
23	2008	G2P[4]	Curto
24	2008	G2P[4]	Curto
24	2008	G2P[4]	Curto

Tabela 13 – Amostras positivas de rotavírus do grupo A detectadas nesta pesquisa, elegíveis à vacinação.

6.5 Caracterização filogenética dos genes que codificam as proteínas virais VP1, VP2, VP3, NSP3 e NSP5

Dentre as amostras identificadas como elegíveis à vacina do rotavírus, foram selecionadas cepas do genótipo típico de infecção em humanos G2P[4], o genótipo identificado em maior proporção neste estudo.

Obteve-se o sequenciamento dos amplicons dos genes que codificam as proteínas estruturais VP1, VP2, e VP3; e as proteínas não-estruturais NSP3 e NSP5 dos rotavírus detectados nas 14 amostras listadas na tabela 14, onde estão especificados os genótipos correspondentes de cada gene.

	VP7	VP4	VP1	VP2	VP3	NSP3	NSP5	Genótipo
Rv Wa	G1	P8	R1	C1	M1	T1	H1	G1-P[8]-R1-C1-M1-T1-H1
Rv Ds-1	G2	P4	R2	C2	M2	T2	H2	G2-P[4]-R2-C2-N2-T2-H2
006_07	G2	P4	R2	X	X	X	X	G2-P[4]-R2-Cx-Mx-Tx-Hx
364_08	G2	P4	X	C	M2	X	X	G2-P[4]-Rx-Cx-M2-Tx-Hx
557_08	G2	P4	R2	X	M2	T2	H2	G2-P[4]-R2-CX-M2-T2-H2
924_08	G2	P4	R2	C	X	T2	X	G2-P[4]-R2-Mx-Cx-T2-Hx
1017_08	G2	P4	R2	C	M2	T2	H2	G2-P[4]-R2-Cx-M2-T2-H2
1134_08	G2	P4	R2	C	M2	T2	X	G2-P[4]-R2-C2-M2-T2-Hx
1190_08	G2	P4	X	X	M2	X	X	G2-P[4]-Rx-Cx-M2-Tx-Hx
1286_08	G2	P4	R1	C	X	X	X	G2-P[4]-R1-Cx-Mx-Tx-Hx
001_12	G2	P4	R2	X	X	X	X	G2-P[4]-R2-Cx-Mx-Tx-Hx
007_12	G2	P4	R2	C	M2	-	X	G2-P[4]-R2-Cx-M2-Tx-Hx
011_12	G2	P4	X	C	M2	X	X	G2-P[4]-Rx-Cx-M2-Tx-Hx
014_12	G2	P4	R2	C	X	X	H2	G2-P[4]-R2-Cx-Mx-Tx-H2
031_12	G2	P4	R2	C	X	T2	-	G2-P[4]-R2-Cx-Mx-T2-Hx
040_12	G2	P4	X	C	M2	T2	H2	G2-P[4]-Rx-Cx-M2-T2-H2
054_12	G2	P4	R2	C	M2	X	X	G2-P[4]-R2-Cx-M2-Tx-Hx
055_12	G2	P4	R2	X	X	X	X	G2-P[4]-R2-Cx-Mx-Tx-Hx
072_12	G2	P4	R2	C	M2	T2	-	G2-P[4]-R2-Cx-M2-T2-Hx
075_12	G2	P4	X	C	X	T2	X	G2-P[4]-Rx-Cx-Mx-T2-Hx
121_12	G2	P4	X	C	X	-	-	G2-P[4]-RX-Cx-Mx-Tx-Hx
144_12	G2	P4	R2	C	X	-	X	G2-P[4]-R2-Cx-Mx-Tx-Hx
141_12	G2	P4	X	C	X	X	X	G2-P[4]-Rx-Cx-Mx-Tx-Hx
146_12	G2	P4	R2	C	M2	-	-	G2-P[4]-R2-Cx-M2-Tx-Hx
147_12	G2	P4	-	C	M2	-	-	G2-P[4]-Rx-Cx-M2-Tx-Hx

Tabela 14 – Constelação de genótipos de 14 amostras analisadas neste estudo. Sequência não obtida (X). Genótipo não determinado (-). Para a orientação gênica foi utilizado o protótipo de origem humana TB-Chen, descrito por Matthijnssens et al., 2008.

6.5.1 Análise da sequência parcial do gene VP1

A região do gene que codifica parcialmente a proteína VP1 de 10 das 12 amostras que foram amplificadas tiveram 93% de similaridade com duas amostras de rotavírus humano provenientes do Brasil - NSC206 e NSC209 -, isoladas em Belém, no Pará, e uma amostra de RV da China, a Hu/TB-Chen, igualmente de origem humana (figura 13). Nota-se que as sequências deste estudo formaram dois grupos com 100% de similaridade. No grupo 1 observa-se baixo nível de identidade da amostra 1134-VP1F em relação às amostras 6-F, 924-F e 1017-F. A sequência 6-F tem 74% de similaridade com as sequências 924-F e 1017-F que entre si têm apenas 60%.

A amostra 007DLESTEV apresentou 100% de identidade com as demais amostras que se agruparam no grupo 1, bem como naquelas que formaram o grupo 2, apesar das diferenças de identidade que existem dentro de cada grupo. O grupo 2 apresentou as amostras 014DSULVP1 com a 001DSULVP1 e ambas com 055DSULVP1 em alta similaridade, correspondendo a 93% e 100% de identidade entre si respectivamente, diferenciando-se a quarta amostra do grupo 2, 054DSULVP1, que, embora tenha sido incluída neste, apresenta baixa similaridade de apenas 54% em relação às demais. Nenhum dos grupos apresentou semelhanças significativas com genes de origem animal.

6.5.2 Análise da sequência parcial do gene VP2

Os genes da proteína VP2 subdividiram-se em dois grupos, apresentando um resultado semelhante à VP1, com as amostras 924VP2-F, 1017VP2-F e 1134-VP2F altamente similares no primeiro grupo (figura14). A amostra 1134-VP2F está mais próxima de 1017VP2-F, com 84% de identidade. Ambas são similares à 924VP2-F em percentual de 100%. No segundo grupo, que é 91% similar ao agrupamento 1, as amostras 007DLESTV e 011DSULVP2 apresentaram 80% de identidade. Os grupos tiveram similaridade reduzida de 66% em relação às amostras oriundas da China e de Belém do Pará.

6.5.3 Análise da sequência parcial do gene VP3

As cinco sequências parciais do gene VP3 incluídas nesta análise formaram dois grupos bastante distintos entre si, de baixa similaridade, com as amostras agrupadas

1134VP3-F, 1017VP3-F e 364VP3-F apresentando percentuais inferiores a 50%, semelhantemente ao segundo grupo formado por 007DLESTV e 011DSULVP3. Ambos os grupos apresentaram apenas 55% de similaridade entre si. A amostra 007DLESTV foi delimitada com expressiva distância das demais (figura 15).

6.5.4 Análise da sequência parcial do gene NSP3

O segmento do NSP3 apresentou um perfil inesperado. As amostras de Manaus agruparam-se de forma que a amostra 557NSP3-F apresentou 100% de similaridade com as amostras 924NSP3-F e 1184NSP3-F e estas, entre si, apresentaram 87% de identidade. Observou-se que o grupo das amostras de Manaus revelaram 100% de similaridade com o grupo que incluiu amostras originadas de Bangladesh (Hu/DS-1), China (Hu/TB-Chen) e Brasil, Belém do Pará (NSC212, NSC209 e NSC206). A amostra 1017NSP3-F ficou desalojada do grupo das amostras de Manaus, mostrando um grau de proximidade com rotavírus porco-aviário recombinante Av-Po-13 (figura 16).

6.5.5 Análise sequência parcial do gene NSP5

As sequências analisadas do gene NSP5 apresentaram baixa similaridade entre si, com 65% de identidade entre as amostras agrupadas 1017NSP5-R e 557NSP5-R, e 67% destas com a 014DSULNSP, agrupada com a amostra da China e três amostras provenientes de Belém, Pará. Ambos os grupos apresentaram um alto percentual de similaridade (89%) com o agrupamento da amostra humana oriunda de Bangladesh e de Belém (figura17).

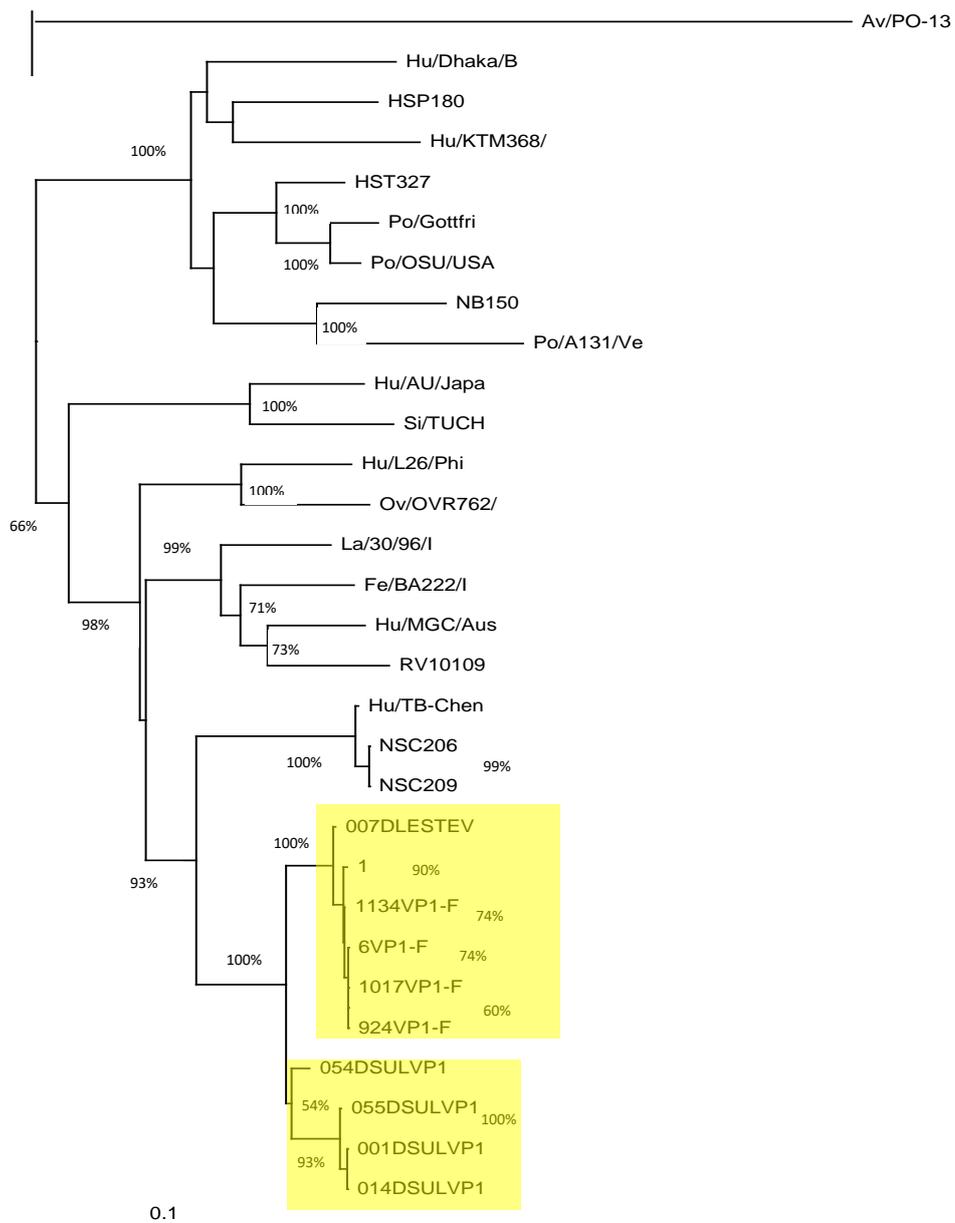


Figura 13 - Dendrograma filogenético do gene que codifica a proteína estrutural de rotavírus VP1, representando a classificação das cepas estudadas. O método Neighbor-joining e Kimura modelo 2 parâmetros foram utilizados para a reconstrução filogenética. Os valores de *Bootstrap* acima de 50% estão indicados nos nós da árvore. As amostras deste estudo encontram-se hachuradas.

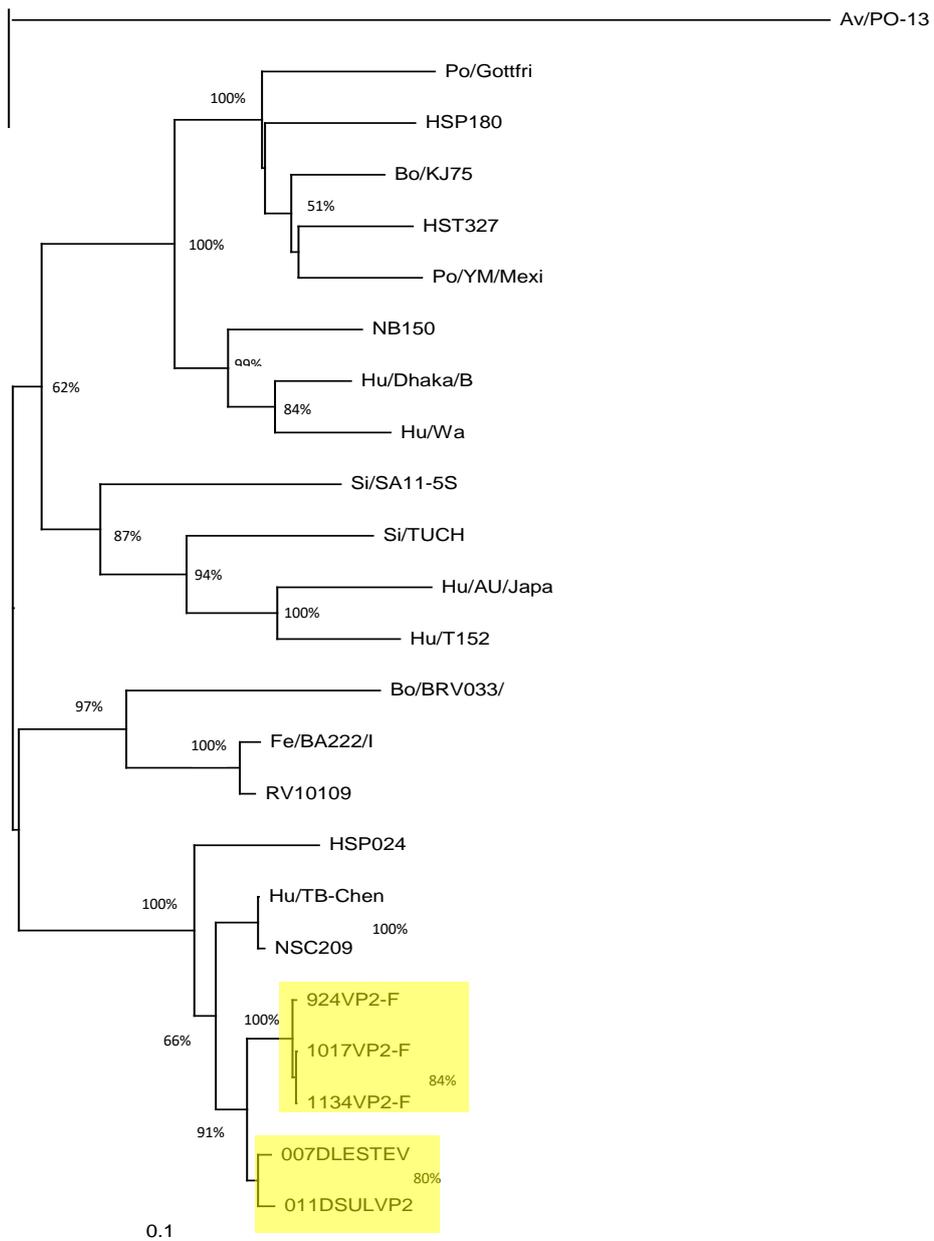


Figura 14 - Dendrograma filogenético do gene que codifica a proteína estrutural de rotavírus VP2, representando a classificação das cepas estudadas. O método Neighbor-joining e Kimura modelo 2 parâmetros foram utilizados para a reconstrução filogenética. Os valores de *Bootstrap* acima de 50% estão indicados nos nós da árvore. As amostras deste estudo encontram-se hachuradas.



0.1

Figura 15 - Dendrograma filogenético do gene que codifica a proteína estrutural de rotavírus VP3, representando a classificação das cepas estudadas. O método Neighbor-joining e Kimura modelo 2 parâmetros foram utilizados para a reconstrução filogenética. Os valores de *Bootstrap* acima de 50% estão indicados nos nós da árvore. As amostras deste estudo encontram-se hachuradas.

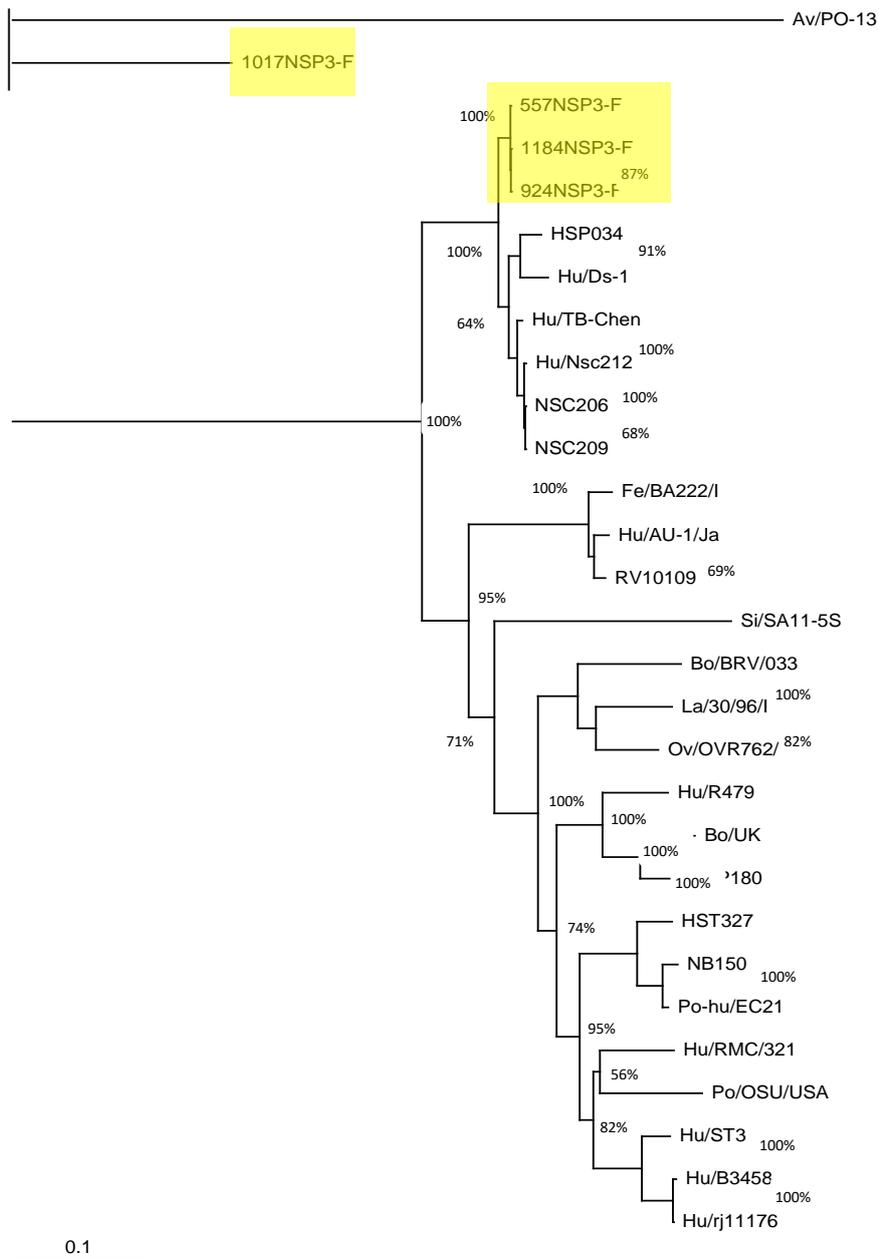


Figura 16 – Dendrograma filogenético do gene que codifica a proteína não-estrutural de rotavírus NSP3, representando a classificação das cepas estudadas. O método Neighbor-joining e Kimura modelo 2 parâmetros foram utilizados para a reconstrução filogenética. Os valores de *Bootstrap* acima de 50% estão indicados nos nós da árvore. As amostras deste estudo encontram-se hachuradas.

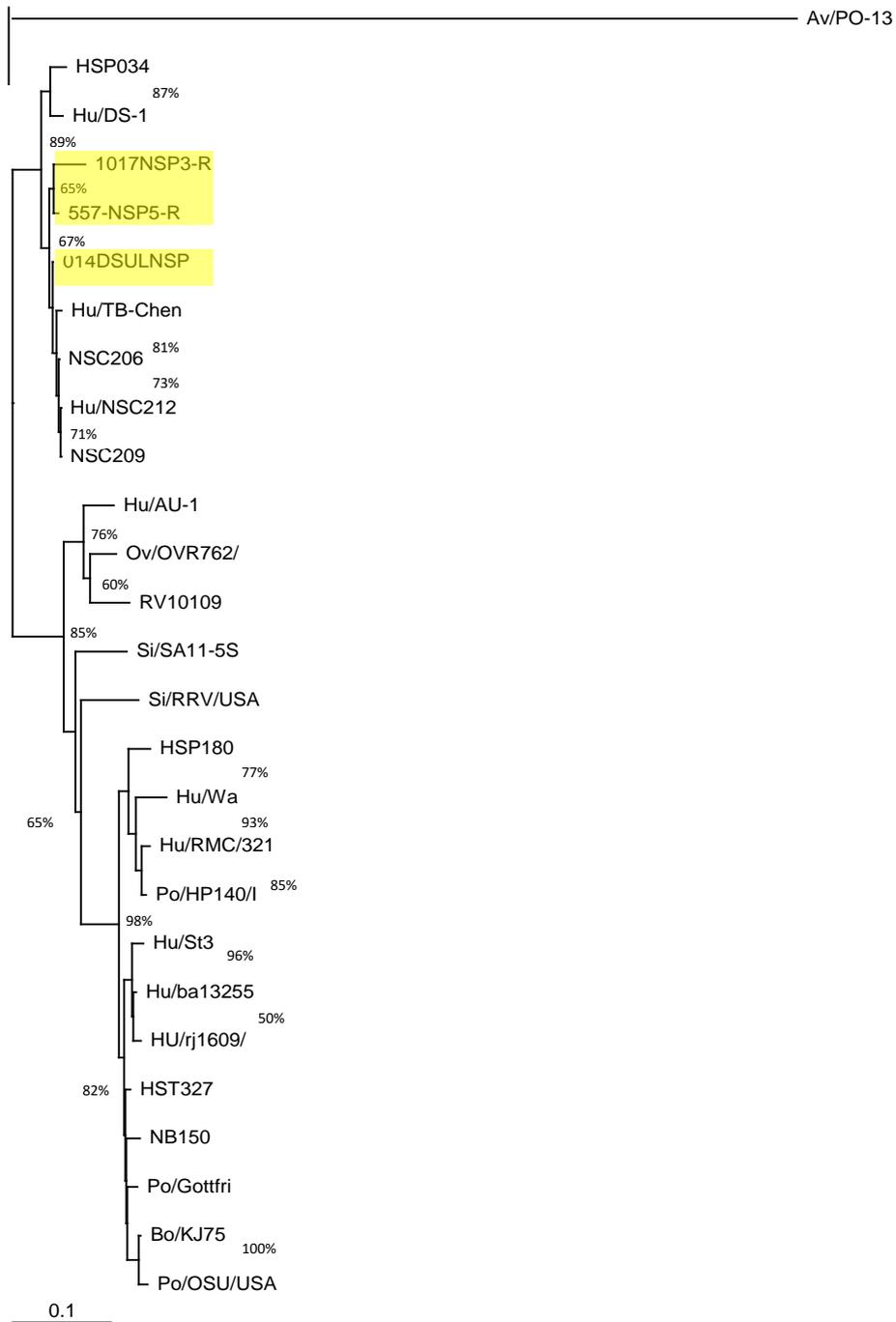


Figura 17 – Dendrograma filogenético do gene que codifica a proteína não-estrutural de rotavírus NSP5, representando a classificação das cepas estudadas. O método Neighbor-joining e Kimura modelo 2 parâmetros foram utilizados para a reconstrução filogenética. Os valores de *Bootstrap* acima de 50% estão indicados nos nós da árvore. As amostras deste estudo encontram-se hachuradas.

7 DISCUSSÃO

A região Norte do Brasil é caracterizada pelo clima quente e úmido, do tipo “Afi” segundo a classificação de Köppen, em que a zona climática “A” corresponde ao clima tropical praticamente sem inverno, com temperatura média sempre superior a 18C⁰; tipo climático “f” que indica a ocorrência de chuvas ao longo de todo o ano, sendo o mês de agosto considerado o mais seco em Manaus, Amazonas; e a variedade climática “i” que indica isoterminia, sem grandes variações anuais de temperatura média. As infecções por rotavírus geralmente não apresentam um padrão sazonal bem definido em áreas de clima tropical, pois distribuem-se ao longo de todo o ano, com maior concentração de casos nos meses mais secos do ano. Estudos realizados no Norte brasileiro para detecção das infecções por RV de fato revelam este perfil de distribuição da rotavirose, com picos mais elevados nos meses de agosto à outubro, o que corresponde aos dados obtidos por nossa equipe (OLIVEIRA et al., 2010; CPRM, 2012; MELO et al., 2013).

Observou-se um percentual de 18,7% de positividade para RV dentre as amostras diarreicas investigadas em Manaus, com declínio dos registros na transição do ano de 2007 para 2008. Estudos realizados entre os anos de 2000 e 2006 nos estados de Rondônia, Pará, Acre, Roraima, Amapá e Tocantins, situados no Norte brasileiro, revelaram que o RV foi a causa de um média de 36,5% dos casos de DDA investigados. Porém, nota-se que a partir do ano de 2006, o número de casos de DDA causada pelo patógeno na região Norte vem apresentando declínio em comparação ao percentual dos anos anteriores (MAGALHÃES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010; MS, 2011a; MS 2011b; MS 2011c; MS 2011d; MS 2011e; MS 2011f; MS 2011g; COSTA et al., 2012).

Em 2003, um estudo realizado em Manaus, com amostras diarreicas de crianças com até 3 anos de idade, evidenciou 46% de positividade para RV do grupo A. Outra pesquisa realizada entre os anos de 2004 a 2006, revelou que o rotavírus foi o responsável por 25% das infecções causadoras da DDA, seguida dos resultados desta pesquisa, realizada em 2007 e 2008, que apontou redução de 6,3% das infecções por

RV na cidade de Manaus, indicando um progressivo declínio nas ocorrências da rotavirose na região (ROCHA, 2003; MELO et al., 2013).

No Brasil, até o ano anterior à inserção da vacina oral do rotavírus humano (VORH), um percentual de 11% a 48% dos casos de diarreia notificados eram atribuídos ao rotavírus. Porém, um novo cenário epidemiológico tem se estabelecido desde a introdução da vacina em 2006. Devido à profusão de medidas de controle e prevenção da DDA em todo o mundo, o percentual de infecções pelo rotavírus tem declinado em todo o mundo. O Brasil apresentou redução de 22% nas taxas de mortalidade infantil e morbidade relacionada à DDA, desde a inserção da Rotarix no calendário vacinal, o que condiz com a redução nos percentuais de ocorrência do RV observados na região Norte (OLIVEIRA et al.2010; CHERIAN, 2011; SANTOS, 2013).

Foi observado um número mais elevado de casos de RV em crianças do sexo masculino, com 58% dos casos detectados. Em estudos realizados entre os anos de 1999 e 2008 com crianças de vários estados do Brasil, notou-se que meninos foram internados em uma taxa um quarto maior que as meninas devido à doença diarreica, confirmando a prevalência dos casos de DDA no sexo masculino nas diferentes regiões do país, diferentemente do que foi observado em outra pesquisa realizada em 2004 a 2006, em Manaus, que descreveu ocorrência similar em ambos os sexos (MORAES et al., 2008; BOCOLLINE et al., 2011; MELO et al., 2013).

Dentre as amostras detectadas, houve prevalência de casos de RV na idade de 0 a 24 meses, correspondendo a 74% dos casos e maior ocorrência na idade entre 0 a 12 meses. Estudos realizados em Manaus, Mato Grosso do Sul e no Triângulo Mineiro, afirmaram semelhantemente a prevalência de casos de rotavirose na faixa etária de até 24 meses de idade. Isto ocorre provavelmente devido ao período do desmame, uma vez que os anticorpos maternos transferidos através do leite protegem a criança de infecções desta natureza. O aleitamento materno exclusivo pode reduzir em até 53% a incidência de hospitalização devido à doença diarreica. O principal mecanismo fisiológico para a redução de morbimortalidade conferido pelo leite materno são seus compostos imunológicos como a IgA secretora e os oligossacarídeos presentes no leite (ANDREASI et al.; 2007; DULGHEROFF, 2010; OLIVEIRA et al., 2010; BOCOLLINE et al., 2011).

Um percentual de 52% das crianças que foram infectadas com o rotavírus, incluídas neste estudo, consumiam água proveniente de poços artesianos, e outros 21% consumiam água encanada. De acordo com a Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais – CPRM (2012), 25% do abastecimento público de água em Manaus provêm do aquífero Alter do Chão, apesar de ser uma cidade cortada por inúmeros rios e igarapés. Na cidade, existem cerca de 15.000 poços, dos quais uma parcela significativa não possui em seus entornos a proteção necessária contra a infiltração de poluentes, além de muitos outros que foram abandonados e não foram devidamente tamponados.

Sabe-se que uma variedade de microrganismos, incluindo os vírus entéricos como o rotavírus, presentes no trato gastrointestinal de pessoas infectadas, são eliminados em grandes quantidades e podem contaminar direta e indiretamente águas destinadas ao consumo humano. Os vírus podem permanecer viáveis durante vários meses na água, resistindo a condições ambientais adversas. A avaliação da qualidade microbiológica da água tem um papel destacado no processo de procedimentos de controle e vigilância, em vista do elevado número e da grande diversidade de microrganismos patogênicos, em geral de origem fecal, que pode estar presente na água (TAVARES et al., 2005; MS, 2006; MIAGOSTOVISCH et al., 2007; CPRM, 2012).

Os genótipos virais identificados nesta pesquisa corroboram com a tendência dos genótipos indicados como emergentes em estudos anteriores a 2006 e o atual cenário das estirpes de rotavírus circulantes no país. Melo et al. (2013), em estudo realizado em Manaus, entre os anos de 2004 e 2006, apontou o genótipo G2P[4] como o quarto mais prevalente entre as cepas identificadas. Estudos realizados entre os anos de 2006 a 2007, em vários estados do Brasil, tais como o Espírito Santo, Sergipe, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí e Tocantins revelaram predominância do genótipo G2P[4] ou G2P[NT] em 74% a 83% das amostras investigadas (LEITE et al., 2008; MORAES et al., 2008).

Estes achados indicaram que tal genótipo poderia ser um marcador de reemergência, uma vez que estava entre os genótipos de maior ocorrência na era pré-vacinação do Brasil, sendo o mais prevalente o genótipo G1P[8] até o ano de 2005, e após o início das investigações nos estados brasileiros, a partir de 2006, ano em que a VORH já havia sido implementada, observou-se o aumento da ocorrência do genótipo

G2P[4]. Este parecia estar refletindo um fenômeno continental, conforme as descrições de epidemias e alta incidência do genótipo, em anos recentes à esta investigação, nas localidades de Honduras, El Salvador, Guatemala, entre outros países. Estes dados se confirmam com os resultados desta pesquisa que revelaram mais de 90% dos genótipos identificados como G2P[4] (LEITE et al., 2008; PATEL et al., 2008; COSTA et al., 2012; MELO et al., 2013).

Existem questionamentos acerca da eficácia da vacina monovalente para a proteção da diarreia aguda grave causada pelo rotavírus G2P[4] na América Latina. Estas cepas são responsáveis por 11% das estirpes de rotavírus circulantes mundialmente, mas a sua frequência varia consideravelmente dependendo da localização geográfica e da idade da criança acometida. Em vários países da África e na Austrália o G2P[4] é a cepa de RV do grupo A mais prevalente (CORREIA et al., 2009; GHOSH et al., 2011).

Dentre as 73 amostras positivas para o RV, detectadas ao longo deste estudo, 55 eram crianças com até 2 anos de idade, ou seja, eram elegíveis à vacina do rotavírus. Os genótipos G2P[4] foram identificados em 51 amostras elegíveis, sugerindo o possível escape deste genótipo à imunização da VORH. Destas amostras, foram selecionadas 14 sequências para a realização das análises filogenéticas de genes estruturais e não estruturais do rotavírus, para a verificação da ocorrência de rearranjos entre amostras de origem humana e animal, bem como a similaridade destas sequências com amostras de genótipo G2P[4] atípicas.

A maioria das sequências investigadas agrupou-se com sequências humanas de mesmo perfil genotípico G2P[4] dentre as quais algumas com padrão na eletroforese similar ao padrão de rotavírus aviário. Apesar desta característica atípica para RV humano, não foram observados indícios de similaridade significativa destas com sequências de genótipos não usuais, de origem animal, exceto o gene que codifica a proteína NSP3 da amostra 1017NSP3-F que alocou-se em uma raiz mais próxima à de RV aviário. Além disso, em todos os genes estudados observou-se a formação de dois *clusters* das sequências de Manaus, ambos com similaridade entre si que variou de 55% a 100%.

Outro padrão observado nos genes estudados foi o agrupamento de todas as amostras originadas de Manaus em um *cluster* que apresentou de 51 a 100% de

similaridade com o agrupamento de amostras provenientes de Belém (Brasil) e de uma amostra da China que, entre si, apresentaram 100% de similaridade. Em ambos os clusters as sequências foram caracterizados com perfil G2P[4]. Estas amostras pertencem a genótipos que circulavam em seus respectivos países antes da implementação da VORH no Brasil, enquanto que aquelas obtidas neste estudo pertencem a genótipos elegíveis à VORH. A China desde o ano 2000 utilizava uma vacina contra o rotavírus, monovalente de origem de cepa de carneiro, o que provavelmente provocou uma pressão seletiva de cepas resistentes à vacina. Em comparação com sequências provenientes de Belém, Pará, antes da implementação da VORH no Brasil, observou-se alta similaridade destas sequências, com variação de 79% a 100% de identidade, o que sugere interação entre genomas virais de diferentes regiões do planeta, que levam à diversificação genética (GUSMÃO, 1994; SESP, 2006; MAESTRI et al., 2012).

Com isso, sugere-se que as sequências correspondentes aos genótipos que provavelmente escaparam à vacinação, oriundas de Manaus, tiveram diferenciações em seus genomas que possivelmente conferiram característica de subsistência à vacina monovalente Rotarix, sugerindo um dos possíveis motivos dessas diferenças de agrupamentos.

Dentre os genes estruturais analisados, as sequências VP3 de 007DLESTV e 011DSULVP3 apresentaram uma significativa distância das demais sequências, indicando maior diferenciação no genótipo G2P[4] e possível surgimento de novos grupos devido às alterações nos genomas virais que geralmente ocorrem devido à pontos de mutação e reagrupamentos gênicos (ESTES & KAPIKIAN, 2007).

Os genes não estruturais NSP3 e NSP5 indicaram dois grupos bem delineados, com a amostra 1017NSP3-F com característica inusitada, pois foi alocada fora do grupo de amostras correspondentes às sequências de Manaus, apresentando um ramo mais próximo do rotavírus aviário, o que pode indicar interação dinâmica com fluxo de material genético entre rotavírus humanos e animais (LAIRD et al., 2003; KHANRIN et al., 2006; MATTHIJNSSENS et al., 2008; BANERJEE et al., 2007).

Com base nas comparações das sequências do genoma completo de RV, tem sido demonstrado que dois grandes genótipos caracterizados como I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 (característico da cepa Wa-like) e I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 (comum

à cepa DS-1-like) circulam em todo o mundo entre os seres humanos. Acredita-se que as cepas de RV humanos Wa-like tenham um ancestral comum com estirpes de RV suínas, enquanto que as estirpes humanas DS-1-like possuem um ancestral comum com cepas RVA bovinos. A introdução do sistema de classificação que engloba o seqüenciamento de todos os 11 segmentos de RV tem facilitado o crescimento exponencial do genoma completo RV dados durante os últimos anos. Portanto as cepas oriundas de Manaus se encaixaram no genótipo DS-1 like, porém três cepas tiveram segmentos VP3, NSP3 e NSP5 que sugeriram maior proximidade de cepas de RV aviário (MATTHIJNSSENS, 2012).

Com base no sistema de classificação dos segmentos de RV, foi possível identificar com muita precisão que a prevalência do genótipo G2P4 nas amostras de Manaus tinha similaridade filogenética com um cluster de cepas isoladas em Belém (Estado do Pará) e da China antes da implementação da vacina no calendário vacinal no Brasil, evidenciando que estas amostras escaparam da pressão seletiva exercida pela vacinação. Estudos de epidemiologia molecular do rotavírus na região Norte do país representam importante contribuição para o entendimento do potencial genético e dos fatores de risco ambientais na ocorrência e na prevenção da doença diarreica. Os mecanismos de variabilidade genética, determinantes da história evolutiva dos microrganismos, são responsáveis pela biodiversidade existente. A vacina torna-se um dos fatores preponderantes para a supressão de cepas virais, ao passo que leva à emergência de outras cepas que persistam e transmitam hereditariamente o escape a esse método de controle e prevenção. Portanto, embora a vacina oral do rotavírus humano venha apresentando importantes reduções nas taxas de diarreia aguda grave em todo o Brasil, constatou-se a identificação de cepas virais que estão sofrendo o processo evolutivo e persistindo à pressão da vacina, o que faz crucial a continuidade das investigações para avaliar-se a eficácia da atual vacina, na busca de constantes aprimoramentos no que tange o controle e a prevenção de doença diarreica causada por rotavírus.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AU K.; CHAN W.; BURNS J.; ESTES W. Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *Journal Virology*. v 63, p. 4553-4562, 1989.

ANGEL J.; FRANCO M.A.; H. B. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nature Review Microbiology*. vol.5, p.529-539, 2007.

ARNOLDI F.; BURRONE O. Role of viral nonstructural proteins in rotavirus replication. *Future Virology.*, Future Science Group, p. 185-186, 2009.

ANDREASI M.; BATISTA S.; OZAKI C.; et al. Rotavirus A among hospitalized infants, up to three years of age, with acute gastroenteritis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Vol. 40, p. 411-414, 2007.

BANERJEE I., ITURRIZA-GOMARA M., RAJENDRAN P., ET AL. Molecular Characterization of G11P[25] and G3P[3] Human Rotavirus Strains Associated With Asymptomatic Infection in South India. *Journal Medical Virology*. P. 1768–1774, 2007.

BLASCO, J.B.B. Epidemiologia de las gastroenterites agudas víricas: aspectos actuales, in: Martínez M.C.V., *Gastroenterites agudas víricas*. València, Editora EMISA, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Capacitação em monitorização das doenças diarreicas agudas – MDDA : manual do monitor / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília : editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento geral de doenças transmissíveis. Doença diarreica aguda (dados). Brasília, editora do Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: Relatório de situação, Amapá. Brasília: editora do Ministério da Saúde, 2011a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: Relatório de situação, Tocantins. Brasília: editora do Ministério da Saúde, 2011b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: Relatório de situação, Pará. Brasília: editora do Ministério da Saúde, 2011c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: Relatório de situação, Rondônia. Brasília: editora do Ministério da Saúde, 2011d.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: Relatório de situação, Roraima. Brasília: editora do Ministério da Saúde, 2011e.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: Relatório de situação, Acre. Brasília: editora do Ministério da Saúde, 2011f.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: Relatório de situação, Amazonas. Brasília: editora do Ministério da Saúde, 2011g.

BISHOP R.F., DAVIDSON G.P., HOLMES L.H., RUCK B.J. Vírus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet*. p.1281-1283, 1973.

BISHOP R.F.; BUGG H.C.; MASENDYCZ P.J.; et al. Serum, fecal & breast milk rotavírus antibodies as indices in mother-infant pairs. *J Infect Dis*. 1996;174 (Suppl 1):S-22-S29.

BEAU, I.; BERGER, A. & SERVIN; et al. Rotavirus impairs the biosynthesis of brush-border-associated dipeptidyl peptidase IV in human enterocyte-like Caco-2/TC7 cells. *Cellular Microbiology*, 2006.

BEURET C., KOHLER D., BAUMGARTNER A.; et al. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl. Environ. Microbiol*. 68: 1925-1931, 2002.

BOCOLLINE C.; BOCOLLINE P.; CARVALHO M.; et al. Padrões de aleitamento materno exclusivo e internação por diarreia entre 1999 e 2008 em capitais brasileiras. *Ciências e Saúde Coletiva*. Vol. 17, p. 1857-1863, 2012.

CARMO EH. Diarreia e rotavírus. *Revista de Saúde Pública*. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsp/v38n6/14.pdf>. p.6, 2004. Acessado em: jul.2012.

CARMO EH. Doença diarreica por rotavirus: magnitude, introdução da vacina e desafios para a vigilância epidemiológica. *Caderno de Saúde Pública*, 2006, vol.22, p.6. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v22n11/01.pdf>. Acessado em: jul.2012.

COLOMINA, J. GIL, M.T., CODOÑER, P. BUESA, J. VP2, VP6 e NSP2 are strongly precipitated by serum and fecal antibody from children with rotavirus symptomatic infection. *Journal of Medical Virology*, p. 58-65, 1998.

CORRÊA E., POSSIK P. A análise de DNA por eletroforese. Disponível em: <http://www.ciencianews.com.br/siteDNA/testesgeneticos.pdf>. Acessado em:jul.2012.

COSTA M.; NOGUEIRA P.; MAGALHÃES G. et al. Rotavirus genotyping in gastroenteritis cases of infantile population from western Brazilian Amazonia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, p.520-522, 2012.

CPRM – Companhia de Pesquisas de Recursos Minerais. Projeto Rede Integrada de Monitoramento das Águas Subterrâneas: relatório diagnóstico Aquífero Alter do Chão no Estado do Amazonas. Bacia Sedimentar do Amazonas/Carlos José Bezerra de Aguiar, Maria Antonieta Alcântara Mourão, Coord. Belo Horizonte: CPRM – Serviço Geológico do Brasil, 2012.

CHOMCZNSKI P. & SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. p. 162:156, 1987.

CDC – Centers for Disease, Control and Prevention. Text books and Publications. Disponível em: <http://www.cdc.gov/rotavirus/index.html>. Acessado em: mar.2013.

DAS B., GENTSCH J., CICCIRELO H.; et al. Characterization of Rotavirus Strains from Newborns in New Delhi, India. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 32, p. 1820-1822, 1994.

DESSELBERGER U, GRAY. J. Rotaviruses, Methods and Protocols. *Methods in Molecular Medicine*. J. Pathol. Vol. 54, n.3, p. 256, 2000.

DONNO A., GRASSI T., BAGORDO F.; et al. Emergence of unusual human rotavirus strains in Salento, Italy, during 2006–2007. *BMC Infectious Diseases*, 9:43, 2009.

DONG Y.; ZENG C.; BALL J.; et al. The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, pp. 3960–3965, *Medical Science*, 1997.

DUSSETY P.; VELASQUÉZ F.R.; et al. Evaluation of the second generation of a commercial latex agglutination test for the detection of rotavirus antigens in fecal samples. *Journal of Clinical Virology*. V. 57 . p. 3, 2013.

ROCHA LA. Aspecto epidemiológico e clínico do rotavírus em crianças hospitalizadas com diarreia aguda em Manaus, Brasil [dissertação]. Manaus (AM): Universidade Federal do Amazonas; 2003.

DULGHEROFF A. Detecção e caracterização molecular de rotavírus do grupo A associados à diarreia infantil na região do Triângulo Mineiro, Brasil [dissertação]. Uberaba (MG): Universidade federal do Triângulo Mineiro, 2010.

DATASUS. Informações de saúde (TABNET) – estatísticas vitais. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sim/cnv/inf10>. Acessado em: mar.2013.

ESTES MK, KAPIKIAN AZ. Rotaviruses. In: Knipe DM and Howley PM, editors-in-chief. *Fields Virology*. Philadelphia:Lippincott Williams & Williams. p.1917-74, 2007.

EICHWALD C., RODRIGUEZ J.F., BURRONE O.R. Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *J. Gen. Virol.* 85:625–634, 2004.

ESPARZA J., GORZIGLIA M., GIL F., ROMER, H. Multiplication of human rotavirus in cultured cells. An electron microscopic study. *J. Gen. Virol.* 47, 461-472, 1980.

FARHAT, C.K., et al. *Infectologia pediátrica*. 2ªed. São Paulo, Editora Atheneu, 1998.

FRIAS A.H., KUMAR M.V., GENTSCH, J.R., et al. Intestinal epithelia activate anti-viral signaling via intracellular sensing of rotavirus structural components. *Nat. Pub. Group* Vol.3 n.6. 2010.

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

GENTSCH J.R., GLASS R.I., WOODS P., et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v.30, p. 1365-73, 1992.

GENTSCH J.R., LAIRD A.R., BIELFELT B., et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis.* 192 (1):146-59. Review, 2005

GHOSH S.; ADACHI N.; GATHERU Z.; et al. Whole-genome analysis reveals the complex evolutionary dynamics of Kenyan G2P[4] human rotavirus strains. *Journal of General Virology*. Vol. 92, p.2201-2208, 2011.

GUSMÃO R.; MASCARENHAS J.; GABBAY Y. et al. Nosocomial transmission of an avian-like rotavirus strain among children in Belém, Brazil. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*. v.12, p. 129-132,1994.

HYSER J.M., ESTES M.K. Rotavirus vaccines and pathogenesis: 2008. *Curr. Opin Gastroenterol.* 25(1):36-43. Review, 2009.

JAYARAM H., ESTES, M.K., PRASAD, B.V.V. Emerging Themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication, *Virus Res.*, 101: p.67-81, 2004.

JIANG B., MAGALDI L.S., DENNEHY P., et al. Cytokines as mediators for effectors or against rotavirus disease in children. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003, 10(6): 995. Doi: 10.1128/CDLI.10.6.995-1001.2003.

JONES S. A brush with rotavirus. *Nature Review Microbiology*, v.4, p.877, 2006.

JOURDAN M., MAURICE M., DELAUTIER D., et al. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional transport that bypasses Golgi apparatus. *J. Virol.* 71, 8268-8278, 1997.

KAPIKIAN AZ, HOSHINO Y, CHANOCK RM. Rotaviruses. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, Strauss SE (eds), *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1787-1833, 2001.

KAPIKIAN AZ, WYATT RG, DOLIN R, THORNHILL TS, KALICA AR, CHANOCK RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol.*10:1075-81, 1972.

KHEYAMI A. M., NAKAGOMI T., NAKAGOMI O., et al. Molecular Epidemiology of Rotavirus Diarrhea among Children in Saudi Arabia: First Detection of G9 and G12 Strains. *Jour. Clin. Microbi.*, Vol. 42, nº4, p. 1185–1191, 2008.

KHANRIN P.; MANEEKARN N.; PEERAKOME S.; et al. Molecular characterization of rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *Journal of Medical Virology.* v.78, p. 986-994, 2006.

LATORRE, M. S.; OLIVEIRA T.C. Tendências da internação e da mortalidade infantil por diarreia: Brasil, 1995 a 2005. *Revista de Saúde Pública.* v.44. p.10, 2010.

LAIRD A.; IBARRA V.; RUIZ-PALACIOS G.; et al. Unexpected detection of animal VP7 genes among common rotavirus strain isolated from children in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, p.4400-4403, 2003.

LIGHT J.S., HODES HL. Isolation from cases of infantile diarrhoea of a filtrable agent causing diarrhoea in calves. *J Exp Med* 90:113-135, 1943.

LINHARES AC, GABBAY YB, FREITAS RB, TRAVASSOS DA ROSA ES, MASCARENHAS JDP & LOUREIRO ECB. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. *Epidemiol Infect* 1989;102:129-145.

LINHARES AC, PINHEIRO FP, SCHMETZ C, MULLER G, PETERS D. [Duovirus (Rotavirus) in Belem, State of Para, Brazil (preliminary report)]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.*19(4):278-9, 1977.

LEITE J. P.; COSTA F.A.; LINHARES, A. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience -A Review. Vol. 103. p. 745-753, 2008.

LEITE J.P.; COSTA F.; LINHARES A. Group A rotavirus genotypes and ongoing Brazilian experience: a review. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 103, p. 745-753, 2008.

LOPEZ T., CAMACHO M., ZAYAS M. et al. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J. Virol*, 79, 184-192, 2005.

LOPMAN B., BROWN D., KOOPMANS M. HUMAN CALICIVIRUS IN EUROPE. *Journal of Clinical Virology.* p. 137-160, 2002.

MATTHIJNSSENS J.; MUSTAFIZ R.; MARTELLA V. Full Genomic Analysis of Human Rotavirus Strain B4106 and Lapine Rotavirus Strain 30/96 Provides Evidence for Interspecies Transmission. *Journal of Virology*, vol.80, p. 3801-3810, 2006.

MATTHIJNSSENS J.; CIARLET M.; HEIMAN E. et al. Full genome-Based Classification of Rotaviruses Reveals a Common Origin between Human Wa-Like and Porcine Rotavirus Strains and Human DS-1Like and bovine Rotavirus Strains. *Journal of Virology*, vol. 82, p. 3204-3219, 2008.

MATTHIJNSSENS J.; RANST M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Elsevier*, vol. 2, p. 426-433, 2012a.

MATTHIJNSSENS J, OTTO PH, CIARLET M , DESSELBERGER U, VAN RANST M, JOHNE R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virology*, vol. 157, p.1177-82, 2012b.

MAGALHÃES G.; NOGUEIRA P.; GRAVA A., et al. Rotavírus e adenovírus em Rondônia. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, vol 102. P.555-557, 2007.

MAESTRI R.; KAIANO J.; NERI D.; et al. Phylogenetic analysis of probable Non-Human Genes of Group A Rotaviruses Isolated From Children With Acute Gastroenteritis in Belém, Brazil. *Journal of Medical Virology*. V.84, p. 10, 2012.

MELO GZ; COSTA C.A; SANTOS IG. Diversidade molecular e rotavírus do grupo A na cidade de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil, 2004 a 2006. *Epidemiologia Serviço Saúde*, v. 22, p. 265-275, 2013.

MIAGOSTOVISCH MP, FERREIRA FF, GUMARÃES FR, et al. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viroses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazônia, Brazil. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Jan. 2008, p. 375–382

MORAES C, ROMANO AC, CARMO GM. Investigação de surto de doença diarreica aguda com detecção de rotavírus. *Paraíso do Tocantins-TO*, julho a agosto de 2006. *SVS*. v.2, p.5, 2008.

NEUZIL K.; PARASHAR U. *Vaccine*. Elsevier, vl. 30, p. A1-A2, 2011.

ONU – Organização das Nações Unidas. A ONU e as crianças. Disponível em: <http://www.onu.org.br/a-onu-em-acao/a-onu-e-as-criancas/>. Acessado em: Fev.2013.

OLIVEIRA DF, MELO J.H., SIMONETTI AC. Rotavírus e sua epidemiologia nas infecções diarreicas. *RBAC*, v.42, p. 169-174, 2010.

PARASHAR UD, HUMMELMAN EG, BRESEE JS, et al. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis*. 9:565-72, 2003.

PATEL MM, DE OLIVEIRA LH, BISPO AM, GENTSCH J, PARASHAR UD. Rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg Infectious Disease*. v. 14, p. 863-865, 2008.

PATEL M.; COLLADA R.; BULHÕES M., et al. Intussusception and health benefits of rotavirus vaccination in Mexico and Brazil. *The New England Journal of Medicine*, v. 34, p. 10, 2011.

Portal da Saúde do SUS. Doença diarreica aguda. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1549. Acessado em: fev.2012.

Portal da Saúde do SUS. Redução da mortalidade infantil. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/cidadao/visualizar_texto.cfm?idtxt=26363. Acessado em: fev.2013.

RAHMAN M., MATTHIJNSSENS J., NAHAR S., et al. Characterization of a Novel P[25],G11 Human Group A Rotavirus. *Jour. Clin. Microb.* 2005, vol. 43, nº 7, p. 3208–3212, 2005.

ROCHA LA. Aspecto epidemiológico e clínico do rotavírus em crianças hospitalizadas com diarreia aguda em Manaus, Brasil [dissertação]. Manaus (AM): Universidade Federal do Amazonas; 2003.

SEHERI L. M., PAGE N., DEWAR J. B., et al. Characterization and Molecular Epidemiology of Rotavirus Strains Recovered in Northern Pretoria, South Africa during 2003–2006. *The Journal of Infectious Disease*, vol. 202, p. 139–S147, 2010.

SAITOU N.; NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v.4, p.406-425, 1987.

SALVADOR P.; ALMEIDA T.; ALVES K., et al. A rotavírose e a vacina oral de rotavírus humano no cenário brasileiro: revisão integrativa da literatura. *Ciência saúde coletiva*, vol.16, n.2, p. 567-574, 2011.

SHARMA N.; BATISH S. Rotavirus vaccine: a new approach for incubating severe diarrhoeal illness in children. *International Journal of Toxicology and Applied Pharmacology*. p.7. 2011.

SIQUEIRA A.; SANTELLI A.; ALENCAR L.R. et al. Outbreak of acute gastroenteritis in young children with death to rotavirus genotype G9 in Rio Branco, Brazilian Amazon region, 2005. *International Journal of Infectious Disease*. p.6, 2010.

TAN M, HUANG P, MELLER J, ZHONG W, FARKAS T, JIANG X. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *Journal Virology*. 77:12562-71, 2003.

TAVARES T.; CARDOSO D.; BRITO W. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. Revista de Patologia Tropical, vol. 34, p. 85-104, 2005.

UNICEF - United Nations Children Found. UNICEF anuncia queda nas taxas de mortalidade na infância. Disponível em: http://www.unicef.org/brazil/pt/media_9989.htm. Acessado em fev.2013.

UNICEF/WHO - The United Nations Children's Fund/World Health Organization. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done. United States of America, 2009. 68 páginas.

VARGHESE V.; GHOSH S.; DAS S. et al. Characterization of VP1, VP2 and VP3 gene segments of a human rotavirus closely related to porcine strains. Virus Genes, vol. 32, p. 241-247, 2006.

VESIKARI T. Rotavirus vaccination: a concise review. Clinical Microbiology and infection. p. 7, 2012.

ViralZone, Rotavírus, 2011. Disponível em: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/107.html#tab6. Acessado em: jun. 2012.

WHO - World Health Organization. World Health Statistics. Disponível em: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/en/index.html. Acessado em: fev.2012.

WHO/UNICEF - World Health Organization/ United Nations Children Found. Countdown to 2015. Maternal Newborn and child survival. United States of America, 2012. 228 páginas.

ZARATE S., ESPINOSA R., ROMERO P., MENDEZ E., ARIAS C. F., E LOPES S. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. J Virol., 74:593-599, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A:

BALIEIRO K.C.; SOARES L.A.; ORLANDI, P.P. Gastroenterite na infância e seu impacto na saúde pública mundial. Revista on-line *Scientia Amazonia*, 2017.



Gastroenterite na infância e seu impacto na saúde pública mundial¹

Karen Campos Balieiro², Leidiane Amorim Soares³, Patrícia Puccinei Orlandi³

Resumo

As gastroenterites humanas estão entre as doenças de maior impacto na saúde pública ao nível mundial. São diversos os agentes etiológicos causadores da diarreia, merecendo destaque o rotavírus, patógeno viral proeminente na gênese de gastroenterite aguda grave na infância, responsável por cerca de 200 mil mortes de crianças em todo o mundo. O rotavírus é constituído por um genoma de 11 segmentos de RNA dupla fita que codificam para 6 proteínas estruturais e 5 proteínas não-estruturais e sua atual classificação é baseada em um sistema que atribui genótipos a cada um dos 11 segmentos do genoma. Estes avanços na compreensão genômica e epidemiológica do vírus possibilitaram o desenvolvimento das vacinas RotaTeq (Merck) e Rotarix (GlaxoSmithKline) de alta eficácia, utilizadas desde 2006. Estratégias como a terapia da reidratação oral e a implementação das vacinas para o combate ao rotavírus foram medidas decisivas para a drástica redução do número de mortes infantis nos últimos anos, principalmente em países de baixa renda. Fato curioso é que as vacinas têm demonstrado maior eficácia em países desenvolvidos que em desenvolvimento. Supostamente isto seria atribuído à diversidade de cepas circulantes nestas regiões, porém não tem sido muito bem fundamentada pelos estudos genômicos, o que merece maiores investigações.

Palavras-Chave: gastroenterite, saúde pública, rotavírus, vacina.

Abstract

The human gastroenteritis are among the diseases of greatest public health impact worldwide. There are several etiologic agents of diarrhea, with emphasis rotavirus, viral pathogen prominently in the genesis of severe acute gastroenteritis in childhood, accounting for over 200,000 deaths in children worldwide. The rotavirus genome consists of 11-segment of double-stranded RNA which encode 5 structural proteins and six non-structural proteins and its current classification is based in a system that assigns genotypes to each of the 11 segments of the genome. Key advances in the genetic and epidemiological understanding of the virus have enabled the development of the highly effective RotaTeq (Merck) and Rotarix (GlaxoSmithKline) vaccines applied since 2006. Strategies such as oral rehydration therapy and the implementation of tailor-made rotavirus vaccines have been decisive for the drastic reduction in the number of infant deaths in recent years, especially in low-income countries. Curious fact is that vaccines have proven more effectiveness in developed than in developing countries. Supposedly, it is attributed to the diversity of circulating strains in these regions, but it has not been very well founded by genomic studies, which deserves further investigation.

Key-words: gastroenteritis, public health, rotavirus vaccine.

1. Introdução

A Organização das Nações Unidas (ONU) estipulou na década de 90 as Metas de Desenvolvimento do Milênio, que incluíram a

redução de dois terços do número de mortes infantis no mundo até 2015. De acordo com dados do relatório de estatísticas da saúde mundial em 2014, da Organização Mundial da Saúde, houve um expressivo declínio nas taxas de mortalidade

¹ Parte do trabalho da dissertação de mestrado da primeira autora do programa de mestrado em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas

² Mestre em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas – karenbalieiro@gmail.com

³ Doutora em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas – leidianebio@hotmail.com

⁴ Pesquisadora da Fundação Oswaldo Cruz ILDM - patricia.orlandi@fiocruz.br



infantil nas regiões continentais abrangidas pela organização (WHO, 2014). A UNICEF, (*United Nations Children Found*) divulgou uma redução de 50% nos indicadores de mortalidade infantil mundial por gastroenterite aguda entre 1990 e 2011. Estimativas apontam que 2,5 bilhões de crianças menores de 5 anos de idade foram acometidas pelas gastroenterites nos últimos anos. Mais da metade desses casos ocorreram em regiões da África e no Sul da Ásia, locais onde são notificados cerca de 90% das mortes decorrentes da diarreia (UNITED NATIONS, 2015).

Apesar deste avanço, os índices de mortalidade infantil por doenças evitáveis permanecem elevados. As gastroenterites humanas ainda são classificadas na atualidade como uma das doenças de grande impacto na saúde pública ao nível mundial. A doença diarreica aguda (DDA) contabilizava 11% dos óbitos na faixa etária infantil até o ano 2000, sendo a quarta doença que mais matava crianças em escala mundial, aproximadamente um milhão e duzentas mil mortes por ano (CDC, 2012). Atualmente corresponde a 9% das mortes na infância, levando a óbito 526 mil crianças com menos de 5 anos de idade a cada ano (LIU et al., 2016). Em maior número que a AIDS, a malária e o sarampo juntos, a diarreia é a causa de 1 entre 10 mortes na infância. É a segunda principal causa de falecimentos entre menores de 5 anos de idade e, quando neste caso combinada com o HIV, torna-se 11 vezes mais mortal (CDC, 2012; LIU et al., 2016; UNICEF, 2017).

Em 1994 foi instituído a Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas (MDDA), um sistema de vigilância de avaliação contínua, presente em mais de 70% dos municípios do país, que notifica os dados referentes à ocorrência da doença diarreica aguda ao Ministério da Saúde (BRASIL, 2009). Foram notificados mais de 34 milhões de episódios de diarreia e registrados mais de 53 mil óbitos por DDA no Brasil entre os anos de 2000 e 2010. Mais de 1 milhão de crianças menores de 5 anos foram acometidas pela DDA somente no ano de 2010. A incidência da doença na faixa etária infantil, no mesmo ano, foi de 119 casos a cada 1000 crianças menores de 1 ano e 82 casos a cada 1000 crianças entre 1 e 5 anos de idade. Somente em 2010, 852 crianças foram a óbito antes que completassem o quinto ano de vida no Brasil (BRASIL, 2010).

Devido aos esforços mundiais pactuados entre diversas nações, incluindo o Brasil, para o

combate aos elevados índices de mortalidade infantil, houve redução destas taxas para menores de 5 anos nas últimas décadas. Em 1990 eram contabilizados 59 óbitos de menores com idade inferior a 5 anos a cada mil brasileiros nascidos vivos. Em 2010 essa taxa passou a ser de 19 para cada mil nascidos vivos (WHO, 2014).

A região Norte do Brasil registrou aproximadamente 5 mil óbitos por causas evitáveis em 2006, números estes que tem declinado ligeiramente desde o ano de 2008. Em 2010 foram registrados 3.671 mortes infantis por causas evitáveis. No mesmo ano, 356 mortes ocorreram na região devido às doenças diarreicas. O Amazonas registrou 731 mortes infantis por causas evitáveis e a segunda maior notificação de mortes por DDA da região Norte, com 109 óbitos, número inferior apenas ao do estado do Pará que registrou 160 mortes causadas pela diarreia no mesmo ano. No Amazonas foram contabilizados mais de 1.430.000 casos de DDA, com 1.445 óbitos registrados entre os anos de 2000 e 2011, dentre os quais 65 óbitos de crianças menores de 5 anos ocorreram em 2000 e 10 óbitos em 2011 (BRASIL, 2012, 2013).

2. Metodologia

As bases de dados utilizadas para a elaboração deste artigo foram Pubmed e Google Acadêmico, com referência ao período de 2000 a 2017. Foram inseridas nos buscadores as palavras: doença diarreica, rotavírus, vacina do RV e epidemiologia.

3. Gastroenterite aguda grave

A doença diarreica aguda é uma síndrome caracterizada pelo aumento do número de evacuações, com fezes aquosas ou com perda de sua consistência, podendo haver em alguns casos presença de muco e sangue. Os episódios da doença diarreica podem ser classificados em dois grupos: diarreia aquosa, e diarreia sanguinolenta. A diarreia aquosa apresenta a perda de grande quantidade de água e evolução acelerada para um quadro de desidratação, enquanto que na diarreia sanguinolenta, ou disenteria, há presença de muco e/ou sangue sugerindo inflamação do intestino. A DDA pode ser de natureza infecciosa ou não infecciosa. Homens, animais e alimentos são reservatórios dos patógenos causadores da diarreia. Existe uma variedade de patógenos causadores da diarreia infecciosa, incluindo



parasitas entéricos, bactérias e vírus, entretanto, apenas um grupo de microrganismos é responsável pela maioria dos casos de diarreia grave na infância. A transmissão ocorre pela via fecal-oral, por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados pelos agentes infecciosos da diarreia (BRASIL, 2017).

3.1 Rotavírus na etiologia da DDA

Dentre os principais agentes etiológicos das gastroenterites humanas merece destaque o rotavírus, causador predominante de diarreia grave na infância (KOTLOFF et al., 2013; LANATA et al., 2013; GÓMEZ et al., 2014; BOWEN et al., 2016; BWOGI et al., 2016). Na década de 80 estudos epidemiológicos, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, revelaram que o rotavírus causava cerca de 870 mil mortes anuais de crianças menores de cinco anos de idade em todo o mundo (UNITED NATIONS, 2015). Devido à implementação da terapia da reidratação oral e a vacinação, este número foi significativamente reduzido para cerca de 200 mil mortes infantis anuais, o que, porém, não retirou do rotavírus a posição de principal microrganismo causador de morbimortalidade infantil em todo o mundo (BOWEN et al., 2016).

Os rotavírus são patógenos de alta transmissibilidade, sendo excretado cerca de um trilhão de partículas virais por mL de fezes. De modo geral, o padrão sazonal das infecções em países temperados estende-se do outono à primavera, enquanto que nos países tropicais ocorre ao longo de todo o ano (KAPIKIAN et al., 1972). Os rotavírus foram descobertos por Bishop em 1973, na Austrália, durante um estudo com enfoque enzimático em secções da mucosa duodenal de crianças com diarreia. Ao observar os cortes histológicos em ME notou a presença de inúmeras partículas virais no interior de vesículas citoplasmáticas. Inicialmente as partículas virais foram denominadas Orbivírus por possuírem uma similaridade com um gênero anteriormente identificado. No mesmo ano Flewett e colaboradores, no Reino Unido, investigaram a associação destes patógenos à ocorrência de gastroenterite aguda na infância e, diferentemente de Bishop, detectaram tais agentes virais em extratos fecais diarreicos observados em ME utilizando a técnica do contraste negativo (BISHOP R., 2009).

Devido à visualização da nítida dupla camada proteica e conformação estrutural passaram à

denominação de Duovírus. Posteriormente foi sugerido que tais agentes virais originassem um novo gênero pertencente à família *Reoviridae*, por apresentarem semelhanças morfológicas com os demais membros desta, sendo por fim designados como Rotavírus, nome oriundo do latim *rota* por exibirem um formado de roda (KAPIKIAN et al., 1972).

Os rotavírus são um gênero de vírus entéricos pertencente à família *Reoviridae*. As partículas virais tem simetria icosaédrica, não envelopada, com medida aproximada de 75 nanômetros de diâmetro, sendo estes os únicos vírus conhecidos por possuírem o genoma composto por 11 segmentos de dsRNA. São constituídos por 6 proteínas estruturais VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7 e 5 proteínas não-estruturais NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, cada uma correspondente à um segmento do genoma. As proteínas estruturais são componentes da tripla camada proteica que circunda o ácido ribonucleico: capsídeo interno (core), capsídeo intermediário e capsídeo externo (DESSELBERGER, 2000).

Em 2008, um sistema de classificação do genoma completo foi desenvolvido para as cepas do rotavírus. Este sistema atribui um genótipo à cada um dos 11 segmentos do genoma, de acordo com os valores do cut-off do percentual de nucleotídeos estabelecido. Após esta classificação, os genes de rotavírus VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 são descritos usando-se a abreviação Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (x = número arábico começando por 1) respectivamente (MATTHIJNSSENS et al., 2008).

3.2 Controle e prevenção da rotavirose

Estratégias como a terapia da reidratação oral e a implementação da vacina para o combate ao rotavírus, foram medidas decisivas para a redução do número de mortes infantis, especialmente em países de baixa renda. Em 2006, os resultados dos ensaios clínicos principais de duas vacinas RotaTeq (Merck) e Rotarix (GlaxoSmithKline) mostraram alta eficácia, 85% a 98%, na prevenção da diarreia na forma grave causada por rotavírus. Além disso, outro importante resultado foi que nenhuma vacina apresentou problemas colaterais de intussuscepção intestinal, situação ocorrida após a introdução da primeira vacina desenvolvida, a RotaShield (Wielth Laderle), que, por esta razão, foi retirada de circulação em 1999 (DENNEHY, 2008; YEOM et al., 2015).



A vacina do rotavírus reagrupado humano-bovino RotaTeq é uma vacina oral, pentavalente, viva-atenuada composta por cinco estirpes de rotavírus reagrupados. Quatro rotavírus reagrupados expressam a proteína VP7 de origem humana (G1, G2, G3, G4) ligados à proteína (P7[5]) da estirpe WC3 bovino. O quinto reagrupamento é proteína P[8] de uma cepa de rotavírus humano ligada à proteína G6 de rotavírus de origem bovina. A RotaTeq é administrada em três doses orais com 1 a 2 meses de intervalo, iniciando entre 6 e 12 semanas de idade (CHRISTIE et al., 2010).

A Rotarix, vacina viva-atenuada de rotavírus humano denominada monovalente, contém a estirpe 89-12, isolada de uma criança infectada com rotavírus. Esta vacina é uma cepa G1P[8], selecionada por representar o antígeno VP7 e VP4 mais comum dos rotavírus humanos. Crianças infectadas com cepas semelhantes desenvolvem ampla reação cruzada na resposta de anticorpos neutralizantes. Portanto essa vacina foi produzida para conter uma única cepa, com base no pressuposto que a primeira infecção por rotavírus impossibilita a segunda infecção na forma grave. Esta vacina é administrada em duas doses, a primeira aos 2 meses e a segunda aos 4 meses de idade (SHARMA; BATISH, 2012).

Após a introdução da vacina oral de rotavírus humano (VORH), houve um expressivo declínio no número de casos de DDA relacionados ao rotavírus e inclusive de outras formas de diarreia em países industrializados e de renda média. Países latino americanos como o México e o Brasil apresentaram declínio de 35% e 22% respectivamente, nas taxas de mortalidade relacionadas à DDA na idade de 5 anos. O Brasil obteve grande avanço no aspecto do controle e prevenção do rotavírus ao incluir a partir de 2006, no calendário básico de vacinação a VORH, licenciada no mercado com o nome Rotarix. Índices apontam que a proteção conferida pela vacina para todas as diarreias causadas por rotavírus é de 70%. Nos casos mais graves, esse percentual sobe para 86% a 98%, e para hospitalização por diarreia varia de 80% a 95% (NEUZIL; PARASHAR; STEELE, 2012; PATTON, 2012).

3.3 Vacinação do RV e sua eficácia

Um programa de vacinação eficaz contra o rotavírus deve levar em consideração a variação

geográfica e a prevalência das cepas virais circulantes mundialmente (BOWEN et al., 2016). A implementação das vacinas RotaTeq (Merck) e Rotarix (GlaxoSmithKline) do RV em muitos países da Europa e Américas desde 2006 tem mostrado importantes resultados na redução da morbidade e mortalidade associada à infecções pelo vírus entérico (YEOM et al., 2015). No entanto, estudos apontam que as vacinas atualmente licenciadas têm mostrado maior efetividade em países desenvolvidos que em desenvolvimento. Essa eficácia reduzida da vacina em países em desenvolvimento está sendo atribuída possivelmente à diversidade de cepas de RV circulantes nestas regiões. Porém esta hipótese não tem sido muito bem fundamentada pelos estudos genômicos (BWOGI et al., 2016).

A partir do mês de maio de 2016 as vacinas do RV foram introduzidas em 38 países elegíveis. Ainda assim, outros países considerados com zonas vulneráveis para a disseminação do vírus ainda não as implementaram. Cerca de 70% dos indivíduos na faixa etária infantil no mundo ainda não tem acesso à vacinação do RV. Com isso, o monitoramento da eficácia na era pós-vacina é uma importante estratégia para influenciar sua inclusão em novas áreas bem como para prover suporte aos países que já as têm introduzido (SCHWARTZ et al., 2017).

4. Conclusão

As doenças diarreicas, apesar de estarem entre as principais causas de mortes evitáveis tanto por profilaxia quanto por tratamento, continuam assumindo o posto de destaque nos índices de morte na infância, sendo a segunda principal vilã dos casos de morbimortalidade infantil em todo o mundo, atingindo principalmente os países de baixa renda. O conjunto de ações que incluem a terapia de reidratação oral, adequação do ambiente das pessoas com o fornecimento de água potável e condições sanitárias mínimas, bem como as vacinas do rotavírus tem trazido resultados progressivos, com a diminuição do número de mortes decorrentes da diarreia grave. As vacinas implementadas desde 2006 em diversos países da Europa, Américas entre outros têm assumido um papel crucial no combate à mortalidade infantil por DDA. Um fato curioso é que as vacinas têm demonstrado maior eficácia em países desenvolvidos que em desenvolvimento, fato este que merece melhores investigações, embora suponha-se que a diversidade de cepas circulantes



nessas regiões e a não inclusão das vacinas em regiões de vulnerabilidade podem influenciar esses resultados. Deste modo, é necessário que se faça uma vigilância constante da epidemiologia da doença para que as autoridades competentes estejam engajadas em elaborar estratégias para impedir que a desidratação continue sendo a causa de mortes infantis no mundo nos próximos anos.

Agradecimentos

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste artigo.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

BISHOP R. Discovery of rotavirus: Implications for child health. *Journal of Gastroenterology and hepatology*, v. 24 Suppl 3, p. S81–S85, 2009.

BOWEN, M. D. et al. Rotavirus strain trends during the postlicensure vaccine era: United States, 2008-2013. *Journal of Infectious Diseases*, v. 214, n. 5, p. 732–738, 2016.

BRASIL. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7^o ed. Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Capacitação em Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas - MDDA. 1^o ed. Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Doenças Diarreicas Agudas (dados). Disponível em: <mdda@saude.gov.br>. Acesso em: 29 ago. 2017.

BRASIL. Indicadores e Dados Básicos - Brasil - 2012. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2012/matriz.htm>>. Acesso em: 29 ago. 2017.

BRASIL. Doença diarreica aguda (DDA). Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/doenca-diarreica-aguda-dda>>. Acesso em: 11 maio. 2017.

BWOGI, J. et al. The epidemiology of rotavirus disease in under-five-year-old children hospitalized with acute diarrhea in central Uganda, 2012-2013. *Archives of Virology*, v. 161, n. 4, p. 999–1003, 2016.

CDC. Diarrhea : Common Illness , Global Killer Centers for Disease Control and PreventionAtlantaCenters for Disease Control and Prevention, 2012. Disponível em: <www.cdc.gov/healthywater/pdf/global/programs/globaldiarrhea508c.pdf>. Acesso em: 7 fev. 2017

CHRISTIE, C. D. C. et al. Pentavalent rotavirus vaccine in developing countries: safety and health care resource utilization. *Pediatrics*, v. 126, n. 6, p. e1499–e1506, 2010.

DENNEHY, P. H. Rotavirus vaccines: An overview. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 21, n. 1, p. 128 - 208, 2008.

DESSELBERGER, U. Emerging and re-emerging infectious diseases. *Journal of Infection*, v. 40, n. 1, p. 3–15, 2000.

GÓMEZ, M. M. et al. Prevalence and genomic characterization of G2P[4] group A rotavirus strains during monovalent vaccine introduction in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 28, p. 486–494, 2014.

KAPIKIAN, A. Z. et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology*, v. 10, n. 5, p. 1075–1081, 1972.

KOTLOFF, K. L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet (London, England)*, v. 382, n. 9888, p. 209–22, 20 jul. 2013.

LANATA, C. F. et al. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A



Systematic Review. PLoS ONE, v. 8, n. 9, p. e72788, 2013.

LIU, L. et al. MCEE-WHO methods and data sources for child causes of death 2000-2015 Acknowledgments Country estimates of child deaths by cause for years 2000-2015 were primarily prepared. World Health Organization, v. 1, p. 20, 2016.

MATTHIJNSSENS, J. et al. Full Genome-Based Classification of Rotaviruses Reveals a Common Origin between Human Wa-Like and Porcine Rotavirus Strains and Human DS-1-Like and Bovine Rotavirus Strains. *Journal of Virology*, v. 82, n. 7, p. 3204–3219, 2008.

NEUZIL, K. M.; PARASHAR, U. D.; STEELE, A. D. Rotavirus vaccines for children in developing countries: Understanding the science, maximizing the impact, and sustaining the effort. *Vaccine*, v. 30, n. suppl. 1, p. A1–A2, 2012.

PATTON, J. T. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discovery Medicine*, v. 13, n. 68, p. 85–97, 2012.

SCHWARTZ, L. M. et al. Rotavirus vaccine effectiveness in low-income settings: An

evaluation of the test-negative design. *Vaccine*, v. 35, n. 1, p. 184–190, 2017.

SHARMA, N.; BATISH, S. Rotavirus vaccine: a new approach for curbing severe diarrhoeal illness in children. *International Journal of Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 2, n. 2, p. 25–30, 2012.

UNICEF. UNICEF Data: Monitoring the Situation of Children and Women. Disponível em: <<https://data.unicef.org/topic/child-health/diarrhoeal-disease/#>>. Acesso em: 1 maio. 2017.

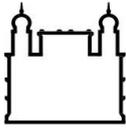
UNITED NATIONS. The Millennium Development Goals Report 2015. New York: [s.n.]. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/wp-content/uploads/2015/07/MDG-2015-June-25.pdf>>. Acesso em: 18 maio. 2017.

WHO. World Health Statistics 2014, p. 180, ed. 2014. Geneva: www.who.int, 2014.

YEOM, J. S. et al. Impact of Rotavirus Vaccine Introduction on Rotavirus-Associated Seizures and a Related Possible Mechanism. *Journal of Child Neurology*, v. 30, n. 6, p. 729–734, 2015.

APÊNDICE B:

Termo de consentimento livre-esclarecido apresentando aos participantes da pesquisa.



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Título do Projeto: **CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DOS ENTEROPATÓGENOS ISOLADOS DE CRIANÇAS DE 0-10 ANOS DE IDADE, COM DIARRÉIA AGUDA E DE REPETIÇÃO NA CIDADE DE MANAUS - AMAZONAS.**

Você está sendo convidado para participar de um protocolo de pesquisa clínica e laboratorial, a ser realizado sob a responsabilidade da FIOCRUZ-MANAUS. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

2. DESENHO DO ESTUDO E OBJETIVOS

A diarreia infantil é um dos maiores problemas de saúde pública do nosso país. Nosso objetivo é conhecer quais são as bactérias, vírus, e parasitas mais frequentes nas crianças atendidas nesta unidade hospitalar pediátrica pública da cidade de Manaus.

3. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS:

Para a realização deste estudo serão realizados os procedimentos para coleta de fezes, através de fraldas e coletores estéreis, por evacuação espontânea ou induzidas com supositório de glicerina.

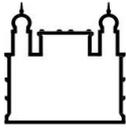
4. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS:

O desconforto para a criança será proveniente da introdução do supositório de glicerina, quando necessário.

5. BENEFÍCIO PARA O PACIENTE:

Este estudo traz vários benefícios direto para a criança, através dele, os médicos terão conhecimento do agente causador da diarreia, podendo direcionar o tratamento adequado para que a criança não precise ficar muito tempo no hospital, assim como não precise tomar medicamentos desnecessários.

6. GARANTIA DE ACESSO AOS REGISTROS MÉDICOS:



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais da pesquisa para esclarecimento das eventuais dúvidas. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o comitê de ética e pesquisa (CEP) na Universidade Federal do Amazonas CEP/UFAM.

7. GARANTIA DA LIBERDADE DA RETIRADA DO CONSENTIMENTO:

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento hospitalar.

8. O DIREITO DE CONFIDENCIALIDADE:

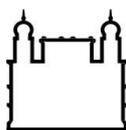
As informações coletadas durante o estudo serão analisadas em conjunto com a de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. As pessoas autorizadas dos órgãos governamentais terão acesso aos resultados, para verificar se o estudo foi devidamente realizado. Isto só pode ser feito com a sua permissão, e é, portanto entendido que pela assinatura do formulário de consentimento informado, você estará concedendo sua permissão.

9. DIREITO DE SER MANTIDO ATUALIZADO SOBRE OS RESULTADOS:

Você terá direito de ser mantido atualizado sobre os resultados da pesquisa, quando estes resultados forem de conhecimento dos médicos e dos pesquisadores.

10. COMPROMISSO DO PESQUISADOR DE UTILIZAR OS DADOS E O MATERIAL COLETADO PARA ESTA PESQUISA:

O pesquisador compromete-se em utilizar os dados e o material coletado somente na pesquisa.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane

TERMO DE CONSENTIMENTO

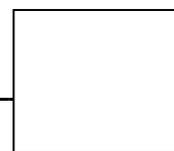
Eu, _____

Responsável pelo menor, _____ aceito participar do projeto de pesquisa “CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DOS ENTEROPATÓGENOS ISOLADOS DE CRIANÇAS DE 0-10 ANOS DE IDADE, COM DIARRÉIA AGUDA E DE REPETIÇÃO NA CIDADE DE MANAUS - AMAZONAS.”, tendo sido informado da justificativa, objetivos e procedimentos que serão utilizados na pesquisa e da liberdade de recusar a participar ou retirar meu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização ou prejuízo ao nosso cuidado.

Manaus, _____ de 2.007.

RESPONSÁVEL: _____

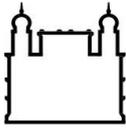
Assinatura



Dra. Patrícia Orlandi
Rua ON casa8 Conj Morada do Sol
Bairro: Aleixo
Tel: 81657049

APÊNDICE C:

Ficha de dados clínicos aplicada aos participantes da pesquisa.



QUESTIONÁRIO PARA ESTUDO DE DOENÇA DIARRÉICA (CASO)

Definição de caso: Crianças com diarreia (maior ou igual a três evacuações de fezes não formadas ou aquosas/dia), por até sete dias.

A) Informações Demográficas

Código _____ nº _____

Nome _____

Idade (no começo da diarreia) _____ data de nascimento ____/____/____

Endereço: _____

Código: _____

B) Informações clínicas

Data desta visita: ____/____/____ data do início da diarreia: ____/____/____

duração da diarreia _____ (dias). Quantos episódios de diarreia teve no último ano: _____

Presença de sinais clínicos

Sintomas	sim () não ()	desconhece ()
Febre	sim () não ()	desconhece ()
Vômito	sim () não ()	desconhece ()
Desidratação	sim () não ()	desconhece ()
Presença de sangue nas fezes	sim () não ()	desconhece ()

C) Informações Epidemiológicas

1. O paciente foi hospitalizado nos últimos 30 dias que antecederam esta doença diarreica?

Sim () Não () Desconhece ()

2. Há em casa outra pessoa não hospitalizada que teve diarreia nas duas semanas antes do início deste caso de diarreia?

Sim () Não () Desconhece ()

3. A criança foi amamentada por quanto tempo? _____

4.

a. Quando uma criança evacua e você a limpa, você lava as suas mãos?

Sempre () habitualmente () as vezes () nunca () desconhece ()

b. Antes de preparar os alimentos você lava as mãos?

Sempre () habitualmente () as vezes () nunca () desconhece ()

c. Após você usar o sanitário você lava as suas mãos?

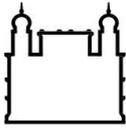
Sempre () habitualmente () as vezes () nunca () desconhece ()

5. A criança está tomando algum antibiótico para essa diarreia?

Sim () Não () Desconhece ()

Se sim:

Que data o tratamento iniciou? ____/____/____



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane

Qual o nome do antibiótico: _____

Informações Laboratoriais

Data de obtenção da amostra ____/____/____

Tipo de amostra de fezes coletada: fezes () swab ()

Foram isoladas amostras de algum patógeno? Sim () Não ()

Se sim: especifique: _____

Presença de Rotavírus: sim () não ()

Presença de outro vírus entérico: sim () não ()

Número de *E.coli* isoladas: _____

Presença de sangue: : sim () não ()

ANEXOS

ANEXO A:

Documento de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal do Amazonas.



PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com o número 266/2006, intitulado: **“Caracterização fenotípica e genotípica dos enteropatógenos isolados de crianças de 0-10 anos de idade, com diarreia aguda e de repetição na região de Manaus-Amazonas”**. Tendo como Pesquisadora Responsável Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 15 de março de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFAM


.....
Profª Drª Maria Rosa Lozano Borrás
Coordenadora