

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

IZABEL JULIEN MARTINI



**“IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS E GENOTIPOS DE
ROTAVÍRUS EM AMOSTRAS FECAIS DE HUMANOS
OBTIDAS NOS SURTOS DE ROTAVIROSE NOS ANOS DE 2003
E 2004 NA CIDADE DE CAMPINBAS, SP.”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>IZABEL JULIEN MARTINI</u> <u>Luiz Filipe Patti</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área de Microbiologia .

Orientadora: Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti

Campinas, 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

M366i	Martini, Izabel Julien Identificação de grupos e genotipos de rotavírus em amostras fecais de humanos obtidas nos surtos de rotavirose nos anos de 2003 e 2004 na cidade de Campinas, SP / Izabel Julien Martini. – Campinas, SP: [s.n.], 2007. Orientadora: Maria Silvia Viccari Gatti. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Rotavírus. 2. Genotipo. 3. Diarréia. I. Gatti, Maria Silvia Viccari. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
--------------	--

Título em inglês: Rotavirus genotypes of group A rotavirus strains circulating in humans in Campinas city, São Paulo, Brazil, 2003-2004.

Palavras-chave em inglês: Rotaviruses; Genotype; Diarrhea.

Área de concentração: Microbiologia.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Maria Silvia Viccari Gatti, Tomomassa Yano, Antonio Fernando Pestana de Castro.

Data da defesa: 19/03/2007.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

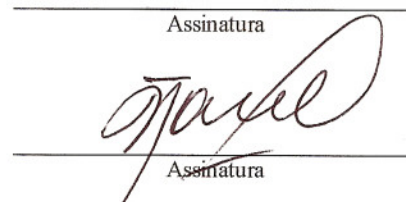
Campinas, 19 de março de 2007.

BANCA EXAMINADORA

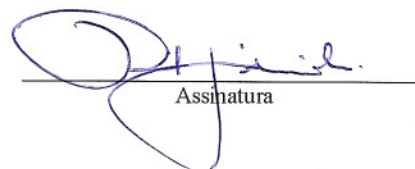
Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro

Assinatura

Assinatura

Prof. Dr. Tomomasa Yano


Assinatura

Dr. Rovilson Gilioli


Assinatura

Prf. Dr. Domingos da Silva Leite

Dedico esse trabalho aos meus pais e ao exemplo de família que construíram, apoiado no amor e no respeito à individualidade.

À minha mãe, Enide, por ser a luz que ilumina os caminhos de nossa família, a minha fonte de inspiração para enfrentar os desafios na busca de alcançar um objetivo e um modelo de “mãe” a ser (per)seguido.

Ao meu pai, Dino, pelo exemplo de dignidade, caráter, profissionalismo e pelo amor dedicado a cada um de nós.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, pela minha família e por absolutamente tudo.

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas e, em particular, ao Instituto de Biologia, onde conclui meu curso de Graduação e o curso de Pós-Graduação. As relações pessoais vividas dentro dessa universidade provocaram mudanças irreversíveis e fundamentais na minha formação pessoal e profissional, pelas quais serei eternamente grata.

Esperando não esquecer de ninguém agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse estudo:

Meus queridos irmãos, Carolina e Bruno: agradeço pelos ensinamentos, pelas confidências, pela amizade, compreensão, companheirismo e, principalmente, pelo amor que vocês têm por mim. Tenho o privilégio de ser a irmã mais nova de duas pessoas tão especiais como vocês.

Rodrigo Costa Di Fiore, meu namorado, pela paciência, compreensão, dedicação, apoio e, principalmente, pelo seu amor e carinho. Rodrigo é um amigo presente, muito generoso e de fácil e agradável convivência. Agradeço por compartilhar parte de sua vida comigo (os bons e os maus momentos) e por tornar a minha vida mais simples, mais fácil, mais colorida e absolutamente muito mais divertida.

Meus queridos amigos da graduação, turma de Biologia 01-Diurno. Agradeço pelos prazerosos anos de convivência e pelo aprendizado constante que recebo de vocês.

Minhas grandes amigas que me apoiaram de forma incondicional, torcendo sempre pelo meu sucesso. O auxílio de vocês foi fundamental para a finalização desse trabalho: Luciana Pimenta, por ter dividido tantos momentos comigo, doces e amargos e pelo seu dom especial em ajudar ao próximo; Simone Bruno, cúmplice de profissão, pelo carinho e apoio sempre presentes; Denise Gomes, Lígia Oliveira, Mariana Lazarini e Patrícia Torres, com quem pude compartilhar, além da amizade, vivências únicas e muito felizes nos períodos em que moramos juntas.

Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, minha orientadora, que com espírito crítico, forneceu idéias e todos os conhecimentos necessários para a minha formação profissional e para a conclusão desse trabalho.

Meus companheiros de trabalho:

Mestra Sandra Soares Martins: minha amiga iluminada em quem sempre pude buscar apoio. A Sandra é generosa e solidária. Está no seu DNA. Não fosse essa sua característica, nada disso teria acontecido. Agradeço o apoio, seu constante estímulo e a disponibilidade nunca negada para apontar caminhos.

Ana Lúcia Rodrigues da Soledade pela grande amizade, pelas confidências e pelo companheirismo. Muito obrigado por dividir sua vida e sua pequena Sophia comigo. Saber de cada etapa do desenvolvimento de sua filha fez crescer ainda mais o amor e admiração que sinto por você.

Carolina Marinelli, Erich Castro, Guilherme Gennari, Maria Clara Fregolente, Marianna Favaro e Stefanie Jordan, pela convivência sempre tão agradável e divertida em nosso laboratório. São amigos que conheci no início dessa caminhada e que espero nunca mais perder de vista.

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite por permitir a utilização de seu laboratório, por todos os ensinamentos e pelo exemplo de profissionalismo. Agradeço de forma especial a todos os funcionários e alunos de seu laboratório: Daniela Domingos, Cláudia de Moura, Erivaldo da Silva, Maria Cláudia Peroto, Mirtis Ferraz e Monique Tiba, pela convivência sempre tão agradável, pelo carinho, ajuda e compreensão.

Prof. Dra. Clarice Weis Arns por também permitir a utilização de seu laboratório e a todos os seus alunos e funcionários pelo auxílio, sempre que necessário.

Agradeço, também, a Profa. Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini, a Profa. Dra. Isabela Cristina Simoni, o Prf. Dr. Armando Moraes Ventura, Prof. Dr. Jorge Veja, o Dr. Rovilson Gilioli e o Prof. Dr. Tomomasa Yano, pela participação em bancas examinadoras (qualificação, pré-banca ou de defesa) e pelas sugestões apontadas.

Maria de Lourdes Fagundes e Silvia Helena Zeferino Evangelista, secretárias do curso de pós-graduação, pela paciência e orientação.

Professores e funcionários da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e aos funcionários da Parasitologia do Departamento de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho: Prof. Dr. Hélio Hehl Caiaffa Filho, Profa. Dra. Lycia Mara Jenné Mímica, Profa. Dra. Yvoty Alves dos Santos Sens; Dra. Patricia Malafronte; Edith Zamai, Eliana Schneider, Maria Aparecida Paschoalotti, Suzethe Sasagawa e Viviane Martins.

Agradeço ainda aos pacientes envolvidos nesse trabalho e à COVISA pelas informações sobre as amostras utilizadas e ao CNPq pelo financiamento.

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria”

1Co 13:2.

MARTINI, I J. Identificação de grupos e genótipos de rotavírus em amostras fecais de humanos obtidas nos surtos de rotavirose nos anos de 2003 e 2004 na cidade de Campinas, SP. 2007. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular, área de Microbiologia) – Universidade Estadual de Campinas.

RESUMO

Gastroenterites e diarreias, doenças comuns em humanos, são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Os rotavírus são um dos principais agentes dessas doenças, acometendo principalmente crianças com idade inferior a três anos. Esses vírus pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*, não envelopados e de simetria icosaédrica. Seu genoma é composto por 11 segmentos de RNA dupla fita que podem separar os rotavírus em sete grupos (RV-A a RV-G), dada a migração desses segmentos em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Os RV-A estão mais frequentemente associados a infecções no homem e em outros animais. Os rotavírus apresentam três camadas protéicas concêntricas, com o capsídeo externo contendo a proteína VP4 e a glicoproteína VP7, indutoras de anticorpos neutralizantes. Variações nas seqüências de nucleotídeos dos segmentos genômicos que codificam para essas proteínas diferenciam os rotavírus em genótipos G (VP7) e [P] (VP4). A distribuição desses genótipos é variável nos diferentes países e a utilização da técnica de *semi-nested* RT-PCR permite a caracterização dos genótipos circulantes, o que é importante para a definição de estratégias vacinais contra esses vírus. O uso de diferentes vacinas contra a rotavirose vem sendo implementado, inclusive no Brasil. Nesse trabalho o objetivo foi caracterizar os genótipos de rotavírus associados a surtos de diarreia em humanos, ocorridos na cidade de Campinas, SP, Brasil, nos anos de 2003 e 2004. Das 328 amostras de fezes estudadas, 98 foram positivas para rotavírus em EGPA, sendo 96 delas RV-A e duas RV-C. Todas as amostras positivas em EGPA para RV-A e outras 96 amostras negativas nesse teste foram submetidas à genotipagem G (G1 a G6 e G8 a G10) e P (P[4] e P[8]). Com os resultados obtidos concluiu-se que a técnica de *semi-nested* RT-PCR foi mais sensível na detecção de rotavírus (73,9%) que a EGPA (50,0%) ($\chi^2=67,06$, valor- $p=0,000$ e Kappa= 0,52). Os genótipos de rotavírus mais frequentes nas amostras coletadas no ano de 2003 (n=38) foram: G1P[8] (38,4%), G3P[8] (15,4%), G5P[8], G9P[8] (7,8%) e G2P[4] (3,9%). Para as amostras enviadas em 2004 (n=290) os genótipos mais frequentes foram: G3P[8] (18,7%), G9P[8] (13,9%), G1P[8] (8,4%), G5P[8] (6,0%) e G4P[8] (5,4%). A proporção de identificação do genótipo G1P[8] no ano de 2004 foi significativamente maior no ano de 2004 (Z= 3,07; valor- $p=0,002$). O genótipo emergente G9 foi identificado em 13,5% (n= 26) das amostras estudadas. Infecções mistas com os genótipos G1 e G2, G1 e G8, G2 e G3, G3 e G5 e G5 e G8 foram identificadas em oito amostras de fezes (4,1%). Nas regiões Sul e Sudoeste de Campinas, consideradas como menos favorecidas socio-economicamente, foi verificada maior variabilidade de genótipos circulantes nos dois anos de análise. Os dados obtidos poderão contribuir para a verificação da eficácia da vacina em uso no Brasil contra a rotavirose.

Palavras- chave: rotavírus; genótipos; diarreia.

MARTINI, I J. Rotavirus genotypes of group A rotavirus strains circulating in humans in Campinas city, São Paulo, Brazil, 2003-2004. 2007. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular, área de Microbiologia) – Universidade Estadual de Campinas.

ABSTRACT

Gastroenteritis and diarrhea are a important cause of morbidity and mortality worldwide. Rotavirus is the most important etiologic agent of these disorders in infants and young children. These viruses, which form a genus of the *Reoviridae* family, are icosahedral, non-enveloped and their genome consists of 11 segments of double stranded RNA. When submitted to electrophoresis in polyacrylamide gels the RNAs of rotaviruses classify these viruses into seven groups (RV-A to RV-G). Group A rotaviruses have been established as the most common cause of severe infections in human and other animals worldwide. The genome of rotaviruses is surrounded by three concentric protein layers. The outer capsid consists of VP4 and VP7 that carry neutralization and protective antigens and allow classification into P and G genotypes, respectively. The VP7 serotype is designated as G serotype (VP7 is a glycoprotein), whereas the VP4 serotype is designated as [P], from protease-sensitive. Many studies have been showed fluctuations in the distribution of rotavirus G-P combinations in many countries, using the semi-nested RT-PCR. These data, in relation of the circulation of different rotavirus genotypes, are important to establish rotavirus vaccine programs. Since a universal immunization of infants with rotavirus vaccine was introduced in Brazil, it becomes important to characterize rotavirus genotypes associated with diarrhea in humans from Campinas, SP, Brazil, in the years of 2003 and 2004. From 328 faecal samples, 98 were positive to rotavirus in polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), being 96 of them belonging to group A and two to RV-C. All the positive samples in PAGE for RV-A and another 96 negative samples to this test were submitted to semi-nested RT-PCR for G (G1 to G6 and G8 to G10) and P (P[4] and P[8]) genotypes determination. The results obtained showed that that semi-nested RT-PCR was more sensitive to the detection of rotavirus (73.9%) than the PAGE (50.0%) ($\chi^2=67.06$, $p=0,000$ and Kappa=0,52). In 2003, in 38 faecal samples analyzed were identified as the genotypes G1P[8] (38.4%), G3P[8] (15.4%), G5P[8] (7.8%), G9P[8] (7.8%) and G2P 4] (3.9%). For the samples sent in 2004 (n=290), the genotypes G3P[8] (18.7%), G9P[8] (13.9%), G1P[8] (8.4%), G5P[8] (6.0%) and G4P[8] (5.4%) were identified. The genotype G1P[8] was identified in a higher proportion in 2004 than in 2003 ($Z=3.07$; $p=0.002$). The emergent genotype G9 was detected in 13.5% of the samples studied. Mixed infections, with G1 and G2, G1 and G8, G2 and G3, G3 and G5 and G5 and G8 were identified in eight faecal samples (4.1%). In the regions of South and Southwestern of Campinas, both of them considered as less socio-economically favored, a high variability of genotypes circulating in the two years of the study was verified. With these data will be able to contribute to the verification of the effectiveness of vaccines in use in Brazil against rotaviruses.

Key- words: rotaviruses; genotype; diarrhea.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Amostras de Fezes.....	18
3.2 Extração do RNA viral para EGPA a partir das suspensões de fezes.....	19
3.3 Extração do RNA viral para as reações de <i>semi-nested</i> RT-PCR a partir das suspensões de fezes.....	20
3.4 Reação de transcrição reversa, seguida da reação em cadeia da polimerase (<i>semi-nested</i> RT-PCR).....	21
3.5 Eletroforese em gel de agarose.....	24
3.6 Análise Estatística.....	24
4 RESULTADOS.....	28
5 DISCUSSÃO.....	41
6 CONCLUSÃO.....	50
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXO – Aceite Comitê Ética da FCM-UNICAMP.....	60

1 INTRODUÇÃO

Gastroenterites e diarreias, doenças muito comuns em humanos, são responsáveis por quadros de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Crianças com idade inferior a três anos são preferencialmente afetadas e calcula-se que, somente nesse grupo de indivíduos, todos os anos, ocorram 700 milhões de casos de diarreia aguda, principalmente em países em desenvolvimento (WILHELM et al., 2003). Desde 1940, suspeitava-se que essas doenças teriam etiologia viral. Contudo, apenas em 1972, KAPIKIAN e colaboradores detectaram a presença de partículas virais em fezes diarreicas (Norwalk virus). Em 1974, BISHOP e colaboradores também reportaram a presença de partículas virais na mucosa duodenal de crianças com gastroenterite. No mesmo ano, FLEWETT e colaboradores denominaram essas partículas de rotavírus pela sua semelhança morfológica à roda (*rota*, em latim), quando observadas em microscopia eletrônica. Desde então, inúmeros estudos confirmaram a etiologia viral nas gastroenterites e diarreias agudas (WILHELM et al., 2003).

Dentre os vírus causadores de gastroenterites e diarreia em humanos, os rotavírus apresentam-se como os principais responsáveis por infecções associadas a diarreias severas, principalmente em crianças. Estima-se que, em todo o mundo, mais de 90% das crianças com idade inferior a três anos sejam infectadas pelo menos uma vez com rotavírus, resultando em 440.000 mortes todos os anos (PARASHAR et al., 2003). Esse fato tem feito com que os rotavírus sejam extensivamente estudados, na busca pelo entendimento de sua patogenicidade e formas de controle das infecções por ele causadas. No Brasil, as infecções por rotavírus em crianças com idade inferior a cinco anos são responsáveis por 4.000 mortes todos os anos (Pesquisa FAPESP, 2006). Além disso, os rotavírus também são considerados importantes

agentes etiológicos para diversos outros animais, estando também frequentemente associados a gastroenterites e casos de diarreia aguda (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996; GLASS et al., 2005).

De acordo com o ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) os rotavírus são classificados como membros da família *Reoviridae* e ao gênero *Rotavirus*. Esses vírus não envelopados têm simetria icosaédrica, com diâmetro entre 70-80nm ou 100nm (partícula completa) e genoma composto por 11 segmentos de RNA de dupla fita (*double stranded* -dsRNA). Cada segmento genômico codifica para pelo menos uma 12 proteínas virais, com exceção do segmento 11 que codifica para duas proteínas (ESTES, 2001). As proteínas dos rotavírus podem ser divididas em dois grupos, constituídos por seis proteínas estruturais (VPs, *viral proteins*), encontradas nas partículas virais, e seis proteínas não estruturais (NSPs, *non-structural proteins*), presentes somente em células infectadas e não observadas em partículas maduras (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996; ESTES, 2001).

Os rotavírus apresentam três camadas protéicas concêntricas: o *core*, o capsídeo intermediário e o capsídeo externo, os quais se comunicam por meio de um complexo de canais (tipos I, II e III) à superfície externa da partícula viral. Todo o conjunto de proteínas estruturais e não-estruturais é codificado por segmentos genômicos presentes no *core* protéico, os quais apresentam pesos moleculares que variam de $0,2 \times 10^6$ a $2,2 \times 10^6$ daltons e tamanhos entre 663 e 3.302 pares de bases (ESTES & COHEN, 1989; KAPIKIAN & CHANOCK, 1996)

O *core* protéico (cerne viral) é a camada mais interna, que envolve os 11 segmentos do genoma, e é formado pelas proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3. Essas proteínas são responsáveis pelas atividades de transcriptase e replicase (ESTES, 2001): a VP1 é a polimerase viral, possuindo atividade RNA-polimerase-RNA-dependente (ESTES & COHEN, 1989). A VP2, proteína mais abundante no *core* viral, constitui o envoltório dessa estrutura, se

liga ao RNA por sua região N- terminal e com isso direciona o empacotamento dos segmentos genômicos na partícula viral. Associada ao complexo da replicação, é essencial para a atividade da enzima replicase. Já a VP3 possui atividade de guanidil e metil transferase (KAPIKIAN & CHANOCK 1996; JAYARAM, et al., 2004).

Circundando o *core* localiza-se o capsídeo intermediário. Esse capsídeo é constituído pela proteína estrutural VP6, que é a mais abundante na partícula viral e é codificada pelo sexto segmento genômico viral. A VP6 é altamente imunogênica, com epítomos conservados e, por essa razão, é utilizada como principal alvo antigênico em ensaios diagnósticos baseados em ensaios sorológicos. Além disso, contém os determinantes antigênicos relativos à separação dos rotavírus nos grupos de A a G (RV-A a RV-G) e sub-grupos A denominados: I, II, I e II e não I e não II. Rotavírus de mesmo grupo compartilham a mesma VP6 (SAIF & JIANG, 1994; KAPIKIAN & CHANOCK, 1996). Atualmente, são conhecidos cinco grupos de rotavírus (RV-A a RV-E), com dois grupos adicionais (RV-F e RV-G). Os rotavírus pertencentes ao grupo A apresentam maior número de hospedeiros, tendo sido encontrados em bovinos, ovinos, eqüinos, primatas, porcos e aves, entre outros animais. Em humanos, foram encontrados apenas RV-A, RV-B e RV-C (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996).

A VP6 está relacionada aos processos de penetração e transcrição endógena dos rotavírus, essa última, uma característica de alguns vírus da família *Reoviridae*. Por ancorar as proteínas externas de ligação do vírus às células hospedeiras, principalmente a VP4, mas também a VP7, participa do processo de penetração na célula, mantendo-se, no entanto, no seu interior, protegendo o genoma viral da degradação por endonucleases celulares. Assim, não há desnudamento total das partículas virais no interior das células e a VP6 mantém os segmentos

genômicos protegidos. Sua associação com a proteína interna VP2 cria o ambiente para a transcrição endógena (JAYARAM et al., 2004; TARAPOREWALA & PATTON 2004).

O capsídeo externo dos rotavírus é composto pela proteína VP4 e glicoproteína VP7. A VP4 possui formato alongado e ápice bilobado, representando a espícula da partícula viral. Codificada pelo quarto segmento genômico, trata-se de uma hemaglutinina sensível à protease e é responsável pela adsorção do vírus às células alvo. Estão associadas ainda a essas proteínas as funções de penetração e virulência (ESTES, 2001). Contêm um sítio de clivagem ou de proteólise para pepsina, produzindo, após a digestão, os fragmentos VP5* e VP8* que aumentam a infectividade viral (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996; ESTES, 2001; JAYARAM et al., 2004). Pela porção VP5* ocorre a ligação dos vírus a integrinas da membrana celular, enquanto a porção VP8* faz a ligação com o ácido siálico (exceção para alguns rotavírus que infectam humanos) (LÓPEZ et al., 2006, ISA et al., 2006).

A proteína VP4 induz a produção de anticorpos neutralizantes resultando no estabelecimento de diferentes sorotipos para RV-A (ESTES & COHEN, 1989). Também são conhecidas seqüências genótípicas de VP4, cuja correlação com os sorotipos ainda não foi totalmente elucidada. Por estudos de sequenciamento e hibridização com sondas foram identificados entre 20 e 21 genotipos P, nomeados com a letra P seguida de algarismos entre colchetes (P[1] a P[21]) (ESTES, 2001).

Já a glicoproteína VP7 é o principal constituinte do capsídeo externo dos rotavírus e o segundo elemento mais abundante nas partículas de rotavírus após a VP6. Codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9, de acordo com a linhagem viral, essa proteína também é capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996). Seu papel durante as etapas iniciais da interação vírus-célula ainda não está totalmente esclarecido.

Tem sido postulado que essa glicoproteína modula a VP4 durante a adsorção e penetração viral e que se ligaria à célula após a interação da VP4. Uma vez a partícula viral no interior da célula, a VP7 seria perdida significando o desnudamento parcial para as etapas seguintes da multiplicação viral (JAYARAM et al., 2004).

Em ensaios com anti-soros hiperimunes foi detectada a especificidade antigênica da proteína VP7, designada pela letra G (glicoproteína), seguida dos algarismos de 1 a 14 (G-1 a G-14) (HOSHINO & KAPIKIAN, 1994). Os genótipos G são definidos por variações no segmento genômico que codifica para VP7, alterações essas que podem acarretar alterações dos epítomos nas proteínas finais. Para os genótipos definidos até o momento não há correspondência total com os sorotipos identificados. Sob pressão seletiva do hospedeiro, essa proteína apresenta alterações em seus epítomos que expressam diferentes genótipos (ESTES, 2001).

As duas proteínas externas dos rotavírus, VP4 e VP7, são consideradas como críticas para o desenvolvimento de vacinas uma vez que induzem a formação de anticorpos neutralizantes importantes na proteção contra a rotavirose. (ESTES, 1996). Os dois genes que codificam para essas proteínas têm segregação independente, o que permite, a classificação dos rotavírus levando-se em consideração os tipos de proteínas G e P presentes em cada linhagem viral. Métodos moleculares que identificam as seqüências de nucleotídeos desses genes, definem os genótipos dos rotavírus (PARASHAR et al., 2006; SANTOS & HOSHINO, 2005).

As proteínas não estruturais dos rotavírus participam dos complexos de replicação pela habilidade de se ligarem ao RNA e atuarem como chaperonas de transporte. Além disso, participam dos sítios de replicação e montagem viral, bem como na condução dos segmentos para o processo de empacotamento (ESTES & COHEN, 1989). De acordo com

JAYARAM e colaboradores (2004), a NSP2, presente no viroplasma, teria três diferentes funções durante as etapas da multiplicação viral: NTPase (nucleotídeo trifosfatase), RNA ligante e desestabilizadora da dupla hélice do RNA viral. Em outras palavras, associada à VP1 e NSP5 (codificada pelo segmento 11, porém com funções pouco estabelecidas), a NSP2 funcionaria como um motor para facilitar o empacotamento do genoma, usando a energia derivada da hidrólise da NTP. A proteína não estrutural NSP3 está intimamente associada aos processos de tradução dos transcritos virais: interage com fatores de alongamento celulares subvertendo a maquinaria de tradução da célula seletivamente para aumentar a tradução dos transcritos virais (JAYARAM et al., 2004; TARAPOREWALA & PATTON, 2004).

A característica segmentada do genoma dos rotavírus permite sua visualização quando submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) (Herring et al., 1982). Cada um dos diferentes grupos de rotavírus, apresentam um padrão típico eletroforético de migração de seus 11 segmentos em EGPA. Há ainda padrões de migração variados em diferentes linhagens dos vírus dentro de um mesmo grupo, o que é conhecido como eletroferotipo. Essa variabilidade nos perfis de migração dos segmentos genômicos se deve, em grande parte, à natureza segmentada do genoma dos rotavírus, proporcionando rearranjos genéticos ao longo de infecções mistas in vivo e in vitro culminando, por fim, com a geração de diversidade genética e genômica (VARGHESE et al., 2004).

Os rotavírus têm uma via de transmissão fecal-oral e são eliminados nas fezes de oito a quarenta dias após a infecção. A transmissão dos rotavírus se dá pela ingestão de água ou alimentos contaminados, pelo contato direto e há relatos que também ocorra por aerossóis (GLASS et al., 2006). Em modelos experimentais há relatos que apenas um vírion pode levar à

infecção (GRAHAN et al., 1987) e GLASS (2006) coloca que apenas dez partículas virais seriam suficientes para fazer uma criança adoecer.

A maioria dos relatos sobre a patogenicidade dos rotavírus vem de observações de modelos experimentais em animais (revisão em LUNDGREN & SVENSSON, 2001). Os vírions infectam os enterócitos induzindo alterações histopatológicas no intestino delgado, principalmente nas regiões do jejuno e íleo. Nesses sítios nota-se hiperplasia das glândulas do intestino, associada ao encurtamento, atrofia e desnudamento dos vilos intestinais (CROUCH & WOODE, 1978; GOMEZ, 1997). Essas alterações configuram-se como consequência de um processo de descamação, ocasionado por uma rápida e extensa infecção das células epiteliais diferenciadas. Como resultado, ocorre redução da área superficial de absorção e na tentativa de reconstituição das regiões afetadas são recrutadas células imaturas, ou seja, células incapazes de absorverem nutrientes (THEIL et al., 1978). Esse fato está diretamente relacionado à ocorrência de diarreia nas infecções por rotavírus, já que essas células acabam por promover depressão nas atividades de dissacaridases e outras enzimas intestinais, interferindo negativamente nos processos de absorção de Na^+ e água e no transporte ativo de glicose (GOMEZ, 1997; ESTES, 2001). Observam-se, também, alterações intracelulares decorrentes das infecções por rotavírus, dentre as quais a distensão das cisternas do retículo endoplasmático, o inchamento das mitocôndrias e irregularidades dos microvilos são as que se configuram como mais frequentes (HOLMES et al., 1975). Este conjunto de modificações estruturais e funcionais nos meios intra e extracelulares culmina com significativa queda na absorção intestinal, vômitos ocasionais, desidratação e comprometimento do metabolismo e do desenvolvimento do hospedeiro, merecendo destaque, no caso de suínos, o ganho de peso deficitário (GOMEZ, 1997).

A ocorrência de diarreia durante as infecções por rotavírus depende da ação de múltiplos fatores e muitos deles ainda não são totalmente compreendidos. Alguns estudos, por exemplo, apontam a proteína não estrutural NSP4, com atividade de enterotoxina, como responsável pelos sintomas iniciais da diarreia. Essa proteína parece interagir com um receptor específico na superfície da membrana celular dos enterócitos, desencadeando uma cascata de reações. Como resultado dessa atividade ocorreriam o aumento da concentração intracelular de cálcio e do fluxo de cloretos e água para a luz do intestino (RAMIG, 2004; PÉREZ-VARGAS et al., 2006). Além disso, os rotavírus também podem estar envolvidos na estimulação dos neurônios secretomotores do sistema nervoso entérico, estimulando a secreção de peptídeos vasoativos intestinais e resultando em aumento da concentração de fluidos e solutos na luz do intestino (LUNDGREN & SVENSSON, 2001; RAMIG, 2004).

Nas infecções por rotavírus observa-se um espectro que abrange as formas assintomáticas ou subclínicas e o quadro clássico, este, em geral, caracterizado pelo início abrupto com vômitos, febre alta e diarreia. Embora crianças possam ser infectadas por rotavírus várias vezes durante suas vidas, infecções primárias após os três meses de idade podem levar a quadros de gastroenterite mais com desidratação. Após essa primeira infecção 40% das crianças ficam protegidas contra infecções subsequentes, 75% ficam protegidas para as gastroenterites por rotavírus e 88% não apresentam gastroenterites severas por estes vírus. A cada nova infecção tem-se progressivamente, maior proteção contra as doenças severas (PARASHAR, et al., 2006).

O caráter severo dos episódios diarreicos associados aos rotavírus ocorre em crianças ao redor do mundo, independente do estrato socioeconômico ou das condições ambientais. Contudo, ele apresenta maior impacto nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, onde existem agravantes como a desnutrição e os simultâneos processos

infecciosos envolvendo outros enteropatógenos (OLIVEIRA & LINHARES, 1999; LINHARES, 2000). As infecções por rotavírus ocorrem no hemisfério norte nos meses mais frios do ano enquanto que no hemisfério sul isto se dá nos meses mais secos. No Brasil, em particular, a circulação dos rotavírus na população humana assume características peculiares já que, nas regiões centro-oeste, sudeste e sul ocorrem surtos nos meses mais secos, enquanto nas regiões norte e nordeste nenhum padrão de sazonalidade tem sido observado (LINHARES, 2000).

Em função da ampla variedade de hospedeiros que apresenta e, conseqüentemente, da maior incidência dos RV-A, estudos relativos a esse grupo são mais freqüentes. O diagnóstico obtido por EGPA identifica os 11 segmentos genômicos dos rotavírus e permite definir o grupo pelo padrão de migração dos mesmos (ESTES & COHEN, 1989). Além desse teste, vários outros podem ser utilizados: visualização direta da partícula viral por microscopia eletrônica (BISHOP et al., 1974); hibridização *in situ* por meio de transcritos RNAss marcados (FLORES et al., 1983), os testes por reação em cadeia da polimerase (PCR) (XU et al., 1990) e imuno-PCR (ADLER et al., 2005), além dos testes imunoenzimáticos utilizando soros monoclonais e policlonais (COULSON et al., 1987).

Gouvêa e colaboradores (1990) desenvolveram a reação de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para amplificação e tipagem dos rotavírus, com base na sequência gênica que codifica a proteína VP7. Atualmente, a RT-PCR está entre as técnicas mais utilizadas para a genotipagem de rotavírus e tem fornecido informações valiosas sobre a diversidade dos genotipos de rotavírus circulantes em todo o mundo. Os genotipos de rotavírus mais freqüentemente associados a doenças em humanos são G1, G2, G3 e G4 além de P[4] e P[8], sendo o G1 o mais freqüente. Além disso, diferentes pesquisas apontam os genotipos G1P[8], G2P[4], G3P[8] e G4P[8] como as combinações entre G e P mais comuns (ESTES,

2001; CASTELLO et al., 2004; SANTOS & HOSHINO, 2005; CARMONA et al., 2006). Outros genótipos, anteriormente não detectados pelos métodos sorológicos, como G5, G6, G7, G8, G9, G10 e G12, além de P[6], P[9] e P[11] em humanos, também são relatados (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2004).

Novas combinações entre os genótipos G e P foram reportadas em diferentes locais do mundo e, desde 1990, pesquisas em diferentes países apontam para o crescimento mundial de amostras com genótipo G9P[8], apresentando-se como o quinto mais frequente (CASTELLO et al., 2004, SANTOS & HOSHINO, 2005; BERNSTEIN, 2006). Além disso, em estudo epidemiológico retrospectivo recente, feito por SANTOS & HOSHINO (2005), os autores alertam para a importância clínica que genótipos mais raros podem apresentar em escala mundial, no caso do genótipo G9 e, em escala regional, no caso dos genótipos G5, G6 e P[6].

Alguns genótipos, como G3, G5, G6 e G8 são detectados em humanos e em animais, sem indícios que comprovem a transmissão direta entre indivíduos de espécies diferentes. Entretanto, alguns estudos determinaram em humanos genótipos de rotavírus mais usualmente encontrados em outros animais, sugerindo a possibilidade de ocorrência de transmissão interespecies ou rearranjos gênicos nas linhagens de rotavírus circulantes (DAS et al., 1993; GRIFFIN et al., 2002).

Diante da gravidade das doenças que os rotavírus podem causar, diversas medidas de controle são aplicadas em todo o mundo. Dentre essas medidas, que têm como objetivo diminuir o número de casos da infecção assim como a gravidade das doenças, está o uso de vacinas atenuadas, administradas pela via oral (GLASS et al., 2005, PARASHAR et al., 2006). Contudo, a introdução dessas vacinas demanda estudos constantes que visem identificar os genótipos circulantes em uma ou mais regiões. Isso se faz necessário já que, em geral, um

determinado genotipo de rotavírus predomina ao longo de um a dois anos em uma dada região, sobrevivendo a emergência de uma nova variedade antigênica. Tal fato ocorre, possivelmente, como resultado de “pressão” exercida pelo número de indivíduos já respondedores para rotavírus (OLIVEIRA & LINHARES, 1999). Atualmente, prevalece o conceito de que o impacto de um imunizante eficaz contra rotavírus incidirá principalmente nos episódios diarreicos mais severos, sendo irrelevante a proteção contra as formas clínicas menos graves. Sendo assim, a vacinação não tem por objetivo evitar as reinfecções por rotavírus e sim, prevenir os casos mais severos da doença que poderiam acarretar internações e, até mesmo, em óbitos (OLIVEIRA & LINHARES, 1999; PARASHAR et al., 2006).

Muitas foram as vacinas desenvolvidas para rotavírus de humanos nos últimos anos, compostas por um ou mais genotipos obtidos de cepas de origem animal ou de origem humana ou, ainda, de rearranjos entre cepas de origem animal e humana (GLASS et al., 2005). A primeira geração de vacinas constituía-se de cepas virais de origem animal, monovalentes e atenuadas. Entre essas aparecem as vacinas derivadas das cepas bovinas RIT4237 (G6P[1]) e WC3 (G6P[5]) e da cepa de macaco RRV (G3P[3]), aplicadas na expectativa da criança desenvolver resposta heterotípica que lhe proporcionasse proteção contra os genotipos prevalentes. Essas vacinas foram pouco eficazes, mas demonstraram que a vacinação por via oral era eficiente para promover a imunização contra rotavírus (BRESEE, et al., 2005).

Após os ensaios com vacinas monovalentes de rotavírus de origem animal, as pesquisas se voltaram para o desenvolvimento de vacinas recombinantes de cepas de origem animal e cepas de origem humana. A obtenção dessas vacinas tornou-se possível já que duas cepas de rotavírus (de origens diferentes ou de mesma origem) podem infectar uma mesma célula (co-infecção). Graças à natureza segmentada do genoma desses vírus, em uma co-infecção, os

segmentos de RNA das duas cepas infectantes podem se misturar, resultando na formação de uma progênie viral com 11 segmentos de RNA dupla fita de origem mista (ESTES, 2001; PÉREZ-VARGAS et al., 2006). No desenvolvimento desse tipo de vacina, misturas entre cepas de rotavírus de humanos com cepas de macacos e de bovinos foram as mais utilizadas. No primeiro grupo, encontra-se a primeira vacina contra rotavírus licenciada e utilizada em larga escala a partir de 1998. Com o nome comercial de *Rotashield* essa vacina quadrivalente expressa a proteína VP7 de rotavírus para os genótipos G1, G2, G3 e G4 e inclui a cepa RRV (genótipo G3 de macaco). Cada criança deveria receber três doses, aos 2, 4 e 6 meses de idade, que levariam à proteção contra os genótipos G de rotavírus presentes na vacina. Contudo, em 1999, o seu uso foi suspenso quando algumas das crianças vacinadas apresentaram quadros de intussuscepção (OLIVEIRA & LINHARES, 1999; BRESEE et al., 2005; PÉREZ-VARGAS et al., 2006).

O risco de ocorrência de intussuscepção associado ao uso da vacina *Rotashield* foi estimado em 1 caso a cada 10.000 vacinados. Após análise das pesquisas realizadas sobre o assunto, o *World Health Organization Global Advisory Committee on Vaccine Safety* (GACVS) constatou que o risco de intussuscepção associado ao uso dessa vacina apresentava-se de forma mais acentuada (20 a 28 vezes maior) no período entre 3 a 7 dias após a primeira aplicação da dose, principalmente em crianças com idade superior a 60 dias. Apesar da ausência da comprovação de que crianças com menos de 60 dias estivessem fora de perigo, sugeriu-se que o risco de intussuscepção, associado à vacinação, poderia estar relacionado com a idade do vacinado (PARASHAR et al., 2006).

No segundo grupo das vacinas recombinantes, encontram-se as vacinas já licenciadas ou perto de licenciamento. Essas vacinas são comercialmente conhecidas como: a) *Rotateq*, baseada no rearranjo com cepas bovinas WC3: é uma vacina pentavalente, capaz de

proteger contra os genótipos humanos mais comuns de VP7 (G1 a G4) e de VP4 (P[8]) e, b) *UK-bovine-human-reassortment-strain*, fundamentada na cepa atenuada UK de rotavírus bovino (G6P[5]) que constitui uma vacina multivalente para os genótipos humanos mais comuns de VP7 (G1 a G4) (BRESEE, et al., 2005).

A vacina *Rotateq*, já licenciada nos EUA, passou por três fases de triagem englobando 70.000 crianças. Em testes realizados principalmente nos EUA e na Finlândia (e uma minoria em outros nove países), a vacina foi administrada em três doses por via oral em crianças com idade entre 6 e 12 semanas, respeitando o intervalo de 4 a 10 semanas entre cada dose. Após a terceira dose, a vacina demonstrou eficácia na proteção de 98% para episódios de gastroenterite grave e 74% para episódios de gastroenterites de qualquer gravidade (PARASHAR et al., 2006). Já a vacina *UK-bovine-human-reassortment-strain*, que está na fase 3 de triagem clínica, em testes realizados na Finlândia, apresentou proteção de 80% para episódios de gastroenterites graves, principalmente em crianças com idade entre 2 e 4 meses (KAPIKIAN et al., 2005; PARASHAR et al., 2006).

As vacinas desenvolvidas a partir de cepas de rotavírus isoladas de humanos podem ser de dois tipos: cepas incomuns, naturalmente atenuadas, isoladas de crianças em período neonatal e sem sintomas clínicos da doença, e cepas atenuadas de amostras comuns de rotavírus. No primeiro caso, encontram-se as vacinas derivadas da cepa RV3 (G3P[6]), isolada de recém-nascidos na Austrália, além da I321 (G10P[11]) e 116E (G9P[11]), isoladas de recém-nascidos na Índia. O desenvolvimento dessas vacinas baseia-se na observação de que crianças em período neonatal, apesar de estarem infectadas por esses tipos incomuns de rotavírus, não apresentavam sinais clínicos da doença. As vacinas desenvolvidas a partir dessas cepas se encontram em fase de testes clínicos para a comprovação de sua eficácia e segurança (BRESEE

et al., 2005). Para o segundo caso, tem-se a Vacina Oral de Rotavírus Humano (VOHR). Licenciada com o nome de *Rotarix* é constituída por vírus atenuados, de um único genotipo: G1[P8] (VESIKARI et al., 2004).

O Ministério da Saúde do Brasil introduziu em março de 2006 a utilização de *Rotarix* para a vacinação em crianças menores de seis meses de idade. Os testes de imunogenicidade e de segurança da vacina foram realizados em 20 países, envolvendo a Europa, América do Norte, Ásia, África e América Latina, incluindo o Brasil (BRESEE et al., 2005). A eficácia da vacina foi avaliada em três estudos, um na Finlândia (n=270) (VESIKARI et al., 2004), outro no México, Venezuela e Brasil (n=570) (SALINAS et al., 2005), e um terceiro, que envolveu onze países da América Latina e a Finlândia (RUIZ-PALACIOS et al., 2006). Nesses estudos, considerando duas doses da vacina, a eficácia para episódios de gastroenterite grave variou entre 68,5% e 90,0%. Para os casos tidos como de gastroenterite de qualquer gravidade a eficácia variou entre 55,7% e 73,0%. Nos casos de hospitalizações devido à doença causada por rotavírus, a eficácia protetora variou entre 65,4% e 93,0%. Os dados da América Latina (Brasil, México e Venezuela) evidenciaram uma eficácia protetora contra gastroenterites em geral, gastroenterites graves e hospitalizações, devido a infecções por rotavírus de 62,9%, 78,3% e 86,0%, respectivamente. A vacina mostrou-se especialmente eficaz na prevenção de casos de doenças por rotavírus associados ao genotipo G1, mas os estudos mostraram que houve proteção cruzada para gastroenterites graves causadas por outras cepas não-G1 (G2, G3, G4 e G9) na ordem de 65 a 100%. Em resumo, a VORH aplicada em duas doses, foi eficaz na prevenção de gastroenterites de qualquer gravidade por rotavírus do genotipo G1 quanto para outros genotipos (G2, G3, G4 e G9), em países desenvolvidos e em desenvolvimento (RUIZ-PALACIOS et al., 2006).

No Brasil, a vacinação se dá pela aplicação de duas doses, sendo que a primeira é feita em crianças com idade entre um mês e meio até três meses e meio (6 a 14 semanas de vida). Já a segunda dose deve ser administrada em crianças com idade entre três meses e meio e cinco meses e meio (14 a 22 semanas de vida). A idade limite estipulada para a vacinação é de 24 semanas, não devendo qualquer dose ser aplicada além dessa idade (Informe Técnico, Ministério da Saúde, 2005).

Em termos gerais, sabe-se que os seis principais genótipos de importância epidemiológica mundial também ocorrem na América Latina: G1 a G4 e G9, P[4] e P[8]. No Brasil, assim como na maior parte de mundo, as combinações de G1 a G4 e G9 com P[8] e G2 com P[4] são aquelas identificadas em maior frequência e, portanto, as mais associadas a doenças (LINHARES, 2000; SANTOS et al., 2003; SANTOS & HOSHINO, 2005; BERNSTEIN, 2006; CARMONA et al., 2006). No estado da Bahia, em estudo feito na cidade de Salvador durante os anos de 1999, 2000 e 2002, 208 amostras fecais diarreicas de crianças hospitalizadas, com idade inferior a 5 anos, foram analisadas. Essas amostras, quando submetidas à genotipagem pela reação de *semi-nested* RT-PCR, apresentaram o genótipo G9P[8] (78,8%) como predominante ao longo dos três anos sendo que, em 2002, esse genótipo foi encontrado em um número de amostras três vezes maior quando comparado aos números de amostras obtidas nos anos anteriores. Os genótipos G1 (12%) e G4 (1,4%) apareceram como o segundo e terceiro genótipos mais frequentes (SANTOS et al., 2005). No estado do Paraná (ano de 2003) e no estado do Rio de Janeiro (nos anos de 2000 a 2004) foram realizados estudos semelhantes. Na cidade de Ponta Grossa, 61 amostras de rotavírus foram genotipadas pela técnica de *semi-nested* RT-PCR, resultando em 86,9% das amostras com genótipo G1P[8], enquanto que o genótipo G9P[8] apareceu em segundo lugar em 3,3% das amostras (PIETRUCHINSKI et al., 2006). O estudo

realizado na cidade do Rio de Janeiro identificou o genotipo de 128 amostras fecais diarreicas de crianças e os resultados apontaram os genotipos G1P[8] (49,6%), G9P[8] (30,2%) e G4P[8] (17,8%) como os mais freqüentes (VOLOTÃO et al., 2006).

Em rotavírus identificados em estudos realizados no estado de São Paulo, essas combinações entre G e P também prevalecem. CARMONA e colaboradores (2006) analisaram aproximadamente 3.000 amostras de fezes de crianças, adultos e idosos com quadro de gastroenterite aguda, entre os anos de 1996 e 2003. Por ensaio imunoenzimático (EIE) rotavírus foram detectados em 774 do total de amostras e os picos de rotavirose concentraram-se nos meses mais frios e secos do ano, ou seja, entre agosto e setembro. Entre as amostras positivas em EIE para rotavírus foram encolhidas ao acaso, 431 delas para a realização de genotipagem G e P pela técnica de *semi-nested* RT-PCR. Os resultados indicaram a prevalência dos genotipos G e P mais comuns em todo o mundo: G1 a G4 e P[4] e P[8]. O mesmo ocorreu com as combinações de G e P, ou seja, o genotipo G1P[8] foi detectado em maior freqüência (66%), seguido pelos genotipos G4P[8] (7,2%), G4P[2] (1%) e G3P[8] (0,8%). Além disso, o estudo também mostra o aparecimento do genotipo G9 a partir do ano 2000 e o crescimento no número de amostras com esse genotipo, principalmente em 2002, quando se destaca como o mais freqüente. De maneira geral, o genotipo G9 foi o segundo mais freqüente, presente em 17,2% das amostras genotipadas. Assim, esse genotipo de rotavírus é considerado como emergente no estado de São Paulo e em outras partes do mundo, o que pode interferir no sucesso dos futuros programas de vacinação (SANTOS et al., 2005; SANTOS & HOSHINO, 2005; PIETRUCHINSKI et al., 2006, CARMONA et al., 2006).

Na região de Campinas, SP, nos anos de 2003 e 2004, ocorreram surtos de rotavirose com algumas centenas de crianças e até mesmo adultos sendo acometidos. O

Laboratório de Virologia do IB/Unicamp colaborou, nesse período, com a Secretaria de Saúde de Campinas, identificando rotavírus nos casos inseridos nos surtos de diarreia. Naquela ocasião não foi realizada a genotipagem das amostras identificadas, o que foi realizado nesse trabalho, visando conhecer os genotipos circulantes nos dois anos em que ocorreram os surtos na cidade. Além disso, com a introdução da vacina VOHR é importante que dados regionais de vigilância da circulação dos genotipos de rotavírus estejam disponíveis para avaliação da eficácia da vacinação. Em outras palavras, foi objetivo desse trabalho utilizar metodologias moleculares para a caracterização de genotipos de rotavírus identificados em casos de diarreia na cidade de Campinas, São Paulo, nos anos de 2003 e 2004.

2 OBJETIVO

Caracterizar os grupos e genotipos de rotavírus associados a surtos de rotavirose em humanos na cidade de Campinas, SP, ocorridos nos anos de 2003 e 2004.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras de fezes

Foram coletadas amostras de fezes de humanos atendidos nas Unidades de Saúde da cidade de Campinas (Centros de Saúde, Ambulatórios, Hospitais, Pronto Atendimento, Laboratórios de Patologia Clínica etc). Essas amostras nos foram encaminhadas pela Coordenação de Vigilância em Saúde da Secretaria Municipal de Saúde (COVISA) da Prefeitura Municipal de Campinas. As coletas ocorreram nos meses de setembro e outubro de 2003 e de agosto a novembro de 2004, meses onde a incidência de casos de diarreia aumentou.

Na época da coleta essas amostras foram analisadas quanto à presença de rotavírus por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) a 7,5%, segundo as recomendações de HERRING et al. (1982), e os resultados foram prontamente encaminhados para a COVISA.

Constituíram características para a coleta das amostras o relato de diarreia por pelo menos dois dias, além da presença de sinais e sintomas de infecção intestinal no momento do atendimento médico.

Cada frasco coletor foi identificado com um número, data de coleta, nome e idade do indivíduo. Para algumas coletas não foi possível a obtenção de todos esses dados. Todas

as amostras, foram mantidas sob refrigeração e enviadas ao Laboratório de Virologia do IB/Unicamp, onde foram cadastradas e congeladas a -20°C e a -70°C .

De cada amostra foi preparada suspensão fecal a 10% em tampão fosfato salina (PBS) 0,01M pH 7,4, após centrifugação a 2.000 rpm por 10 minutos (Rotor JA-14, centrífuga JA21-Beckmann). Essa suspensão foi estocada a 8°C para posterior extração do RNA viral.

3. 2 Extração do RNA viral para EGPA a partir das suspensões de fezes

A extração do RNA dupla fita de rotavírus foi realizada segundo HERRING et al. (1982) com modificações. A 500 μL da suspensão de fezes a 10% foram adicionados 50 μL de solução de duodecil sulfato de sódio. Após incubação a 37°C por 30 minutos e acréscimo de 500 μL de fenol-clorofórmio (v/v) a suspensão foi agitada em Vortex por 1 a 2 minutos e, em seguida, centrifugada a 12.000 rpm (centrífuga Eppendorf-5402, rotor F-45) por 10 minutos a 4°C . À fase aquosa coletada deu-se a adição de 40 μL de NaCl a 20% e 1.000 μL de etanol gelado, sendo a solução incubada a -20°C por 18 horas. Após centrifugação a 12.800 rpm (centrífuga Eppendorf-5402, rotor F-45) por 10 minutos a 4°C , o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 20 μL de mistura dissociante. Antes de ser submetido à EGPA esse precipitado foi incubado a 56°C por 10 a 15 minutos.

A determinação da positividade para rotavírus resultou da análise dos padrões de migração dos segmentos genômicos de rotavírus em gel de poliacrilamida a 7,5% (HERRING et al., 1982). Após a corrida eletroforética o gel foi impregnado por prata, segundo descrições de SAMMONS et al. (1981).

Como controle positivo para as corridas eletroforéticas foram incluídas amostras de rotavírus do grupo A (SA-11), cultivadas em células MA104 ou CaCo-2.

3. 3 Extração do RNA viral para as reações de *semi-nested* RT-PCR a partir das suspensões de fezes

Para a genotipagem G (VP7) e genotipagem P (VP4), 96 amostras positivas para RV-A em EGPA foram submetidas à reação de transcrição reversa (RT-PCR), seguida da reação em cadeia da polimerase (*semi-nested* RT-PCR), segundo protocolos descritos por GOUVEA et al. 1990, 1994 e GENTSCH et al., 1992, com modificações no que se refere à extração do dsRNA viral utilizando Trizol® Reagent (Gibco BRL 15596). Outras 96 amostras negativas para em EGPA também foram submetidas às mesmas reações.

Para a extração do RNA viral ao volume de 300µL de suspensão fecal foram acrescentados 900µL de Trizol®, sendo o conteúdo homogeneizado e posteriormente incubado à temperatura ambiente (TA) por 5 minutos. Seguiu-se a adição de 240µL de clorofórmio, agitação manual vigorosa por 15 segundos e incubação à TA por 2 minutos. A suspensão foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C (rotor JA-14, centrífuga JA21-Beckman®), sendo a fase aquosa (superior) transferida para outro tubo. O início da precipitação do RNA viral deu-se por meio da adição de 700µL de álcool isopropílico (Merck) e subsequente incubação à TA por 10 minutos. Em seguida, centrifugou-se a reação a 12.300 rpm por 5 minutos à TA (rotor FA-MICRO 2.0/1.5 mL, centrífuga Sorvall MC12) e o sobrenadante foi removido de maneira a não tocar as paredes ou o fundo do tubo. Foram adicionados, então, 900µL de etanol 75% gelado e a suspensão foi submetida a agitação em Vortex por um minuto. Seguiu-se nova centrifugação, agora a 9.700 rpm por 5 minutos à TA (rotor FA-MICRO 2.0/1.5 mL, centrífuga Sorvall MC12),

sendo o sobrenadante retirado do mesmo modo e o tubo seco por 10 minutos. Após remoção do clorofórmio por lavagens com álcool, o RNA precipitado foi ressuspensionado em 30µL de H₂O deionizada estéril tratada com 1% de DEPC (dietilpirucarbonato) e estocado a -20°C.

A cada extração das suspensões fecais efetuou-se, também, a extração de amostras tidas como controles positivos para as extrações e reações de *semi-nested* RT-PCR: amostra humana hp01, genotipo G1; amostra 3955 de suíno, genotipo G3; amostra 3949 de suíno, genotipo G5; amostra WI61, genotipo G9 e amostra Wa, genotipo P[8]. Como controle negativo das reações utilizou-se 10µL H₂O DEPC.

3. 4 Reação de transcrição reversa, seguida da reação em cadeia da polimerase (*semi-nested* RT-PCR)

Foram seguidas as recomendações de GOUVEA et al., 1990 e 1994 e GENTSCH et al., 1992, com modificações nas temperaturas de denaturação e anelamento dos *primers*.

A denaturação do ácido nucléico viral foi feita da seguinte forma: em um tubo contendo *primers* consenso End-9 500nM/Beg-9 500nM para genotipagem G ou Con2 500nM/Con3 500nM para genotipagem P (Quadro 1) foram adicionados 10µL do RNA extraído. A mistura foi submetida a 99°C por 5 minutos (Perkin Elmer Gene Amp. PCR System 9600) e, após denaturação das duplas fitas de RNA, os tubos foram transferidos rapidamente para banho de gelo.

Para a reação de transcrição reversa e síntese de cDNA a partir do RNA extraído e desnaturado, deu-se a preparação da mistura de reagentes (*mix*) em H₂O DEPC

contendo tampão 5x *First Strand* (Invitrogen), dNTP 500µM (Invitrogen) e DTT 10nM (Invitrogen). Foram adicionadas 4U da enzima transcriptase reversa de Moloney Murine Leukemia Virus (Invitrogen) por µL de reação e, posteriormente, 13,4µL do *mix* foi distribuído em cada tubo (totalizando 25µL). A síntese de cDNA ocorreu a 37°C por 1 hora, seguida da desnaturação da transcriptase reversa a 95°C por 2 minutos e transferência imediata para banho de gelo (Perkin Elmer Gene Amp. PCR System 9600).

Nesta primeira etapa, a utilização de *primers* comuns (consenso) para RV-A objetivou a amplificação do cDNA correspondente aos segmentos genômicos referentes à VP4 (genotipagem P) e VP7 (genotipagem G). A amplificação do cDNA envolveu o preparo de nova mistura de reagentes (*mix*) em H₂O DEPC contendo tampão PCR-10x (Invitrogen), MgCl₂ 2mM (Invitrogen), dNTP 200µM (Invitrogen), Taq DNA polimerase 2,5U (Invitrogen) *primers* consenso End-9 200nM/Beg-9 200nM para amplificação do segmento de cDNA referente à VP7 ou *primers* consenso Con2 200nM/Con3 200nM para amplificação do cDNA relativo à VP4. De cada tubo da reação de transcrição reversa foram aliqotados 5µL e esse volume foi misturado a 45µL de *mix* de PCR. O total de 50µL foi denaturado a 94°C por 2 minutos e submetido, para a amplificação do segmento de cDNA referente à VP7, a 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 53°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, extensão do amplificado a 72°C por 7 minutos e incubação a 4°C. Já para amplificação do segmento de cDNA referente à VP4, foram 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, extensão do amplificado a 72°C por 7 minutos e incubação a 4°C (Perkin Elmer Gene Amp. PCR System 9600).

Os produtos de DNA obtidos da primeira reação de PCR foram utilizados como moldes para a reação de *semi-nested* RT-PCR. O emprego de *primers* internos de maior especificidade objetivou a amplificação de fragmentos de tamanhos distintos para a genotipagem

G (VP7) e P (VP4). Para a realização desta etapa foi preparado um *mix* em H₂O DEPC contendo volume de tampão de PCR -10x para uma concentração final de 1x (Invitrogen), MgCl₂ 2mM (Invitrogen), dNTP 200 µM (Invitrogen), Taq DNA polimerase 2,5U (Invitrogen). Incluiu-se no *mix*, para genotipagem G, uma dentre duas possíveis combinações de *primers* (200nM), a saber: End-9 (consenso) + Mix G-I [aBT1 (G1), aCT2 (G2), aET3 (G3), aDT4 (G4) e aFT9 (G9)] ou Beg-9 (consenso) + Mix G-II [FT5 (G5), DT6 (G6), HT8 (G8), ET10 (G10)] (Figura 1).

Para genotipagem P deu-se a adição dos *primers* Con3 200nM, 1T-1 200nM e 2T-1 200nM ao *mix* de *semi-nested* RT- PCR (Figura 2). As características dos iniciadores internos utilizados para a amplificação de fragmentos dentro dos segmentos de DNA relativos a VP7 e VP4 encontram-se definidas no Quadro 1.

A uma alíquota de 48µL de *mix* de *semi-nested* RT-PCR foram adicionados 2µL do produto da primeira amplificação. O total de 50µL foi denaturado a 94°C por 2 minutos e submetido a 30 ciclos de reação. A reação de *semi-nested* RT- PCR para a genotipagem G foi conduzida de forma diferente, conforme as combinações de iniciadores: para End-9 + Mix G-I os ciclos ocorreram a 94°C por 1 minuto, 53°C e 72 °C por 2 minutos cada e para Beg-9 + Mix G-II, foram completados 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C e 72°C por 2 minutos cada. Já na reação de *semi-nested* RT- PCR para a genotipagem P, os 30 ciclos ocorreram a 94°C por 1 minuto, 50°C e 72°C por 2 minutos cada. Posteriormente, seguiu-se a extensão das fitas a 72°C por 7 minutos e incubação a 4°C (Perkin Elmer Gene Amp. PCR System 9600). Dessa forma, teve-se como meta a geração de fragmentos de tamanhos distintos correspondentes, um a um, a determinado genotipo viral (G ou P) (Quadro 1).

3. 5 Eletroforese em gel de agarose

Os amplicons e os produtos da extração de dsRNA com Trizol® foram submetidos à corrida eletroforética (80v, 400mA) por uma hora e vinte minutos em gel de agarose a 1,5%. Os resultados foram observados em transluminador-UV após 10 minutos em solução de brometo de etídio.

3. 6 Análise Estatística

Os resultados obtidos em EGPA e em *semi-nested* RT-PCR foram analisados pelos testes de Qui-quadrado e Kappa, com o objetivo de comparar o desempenho de cada técnica na identificação de rotavírus nas amostras de fezes de humanos analisadas. Os genotipos identificados nessas amostras tiveram suas frequências de detecção comparadas pelo teste de duas proporções (Z).

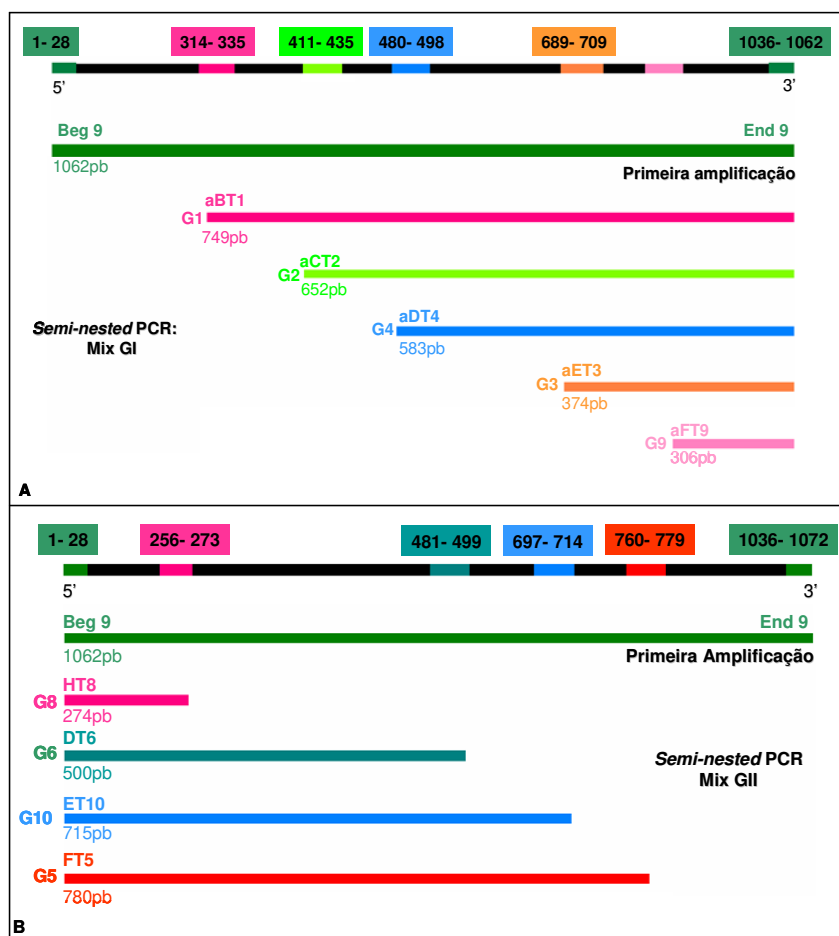


Figura 1. Representação esquemática do segmento genômico que codifica para VP7 de rotavírus do grupo A, com seus iniciadores consenso Beg9 e End9 e localização e tamanho das seqüências de nucleotídeos para a identificação dos genótipos G pela *semi-nested* RT-PCR. (A) G1 a G4 e G9 (GOUVEA et al., 1990). (B) G5, G6, G8 e G10 (GOUVEA et al., 1994).

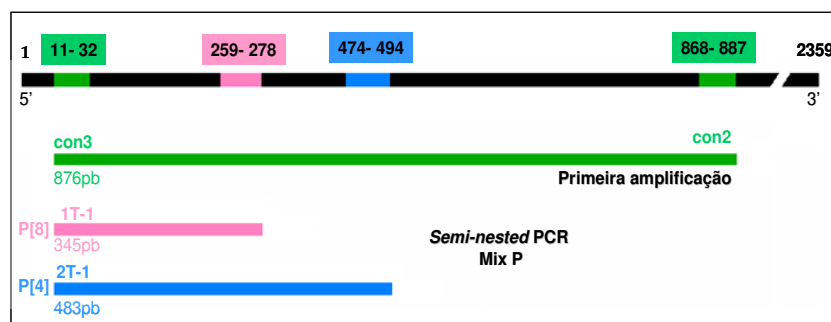


Figura 2. Representação esquemática do segmento genômico que codifica para VP4 de rotavírus do grupo A com seus iniciadores consenso Con3 e Con2 e localização e tamanho das seqüências de nucleotídeos para a identificação dos genótipos P[4] e P[8] pela *semi-nested* RT-PCR (GENTSCH et al., 1992).

<i>Primer</i>	Seqüência de nucleotídeos (5' – 3')	Genotipos	Tamanhos	Referências
Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTG	Comum*	1062 pb	Gouvea et al., 1990
End9	GGTCACATCATACAATTCATTTCAAG	Comum*	1062 pb	Gouvea et al., 1990
aBT-1	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	G1	749 pb	Gouvea et al., 1990
aCT-2	CAATGATATTTAACACATTTTCTGTG	G2	652 pb	Gouvea et al., 1990
aDT4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	G4	583 pb	Gouvea et al., 1990
aET-3	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	G3	374 pb	Gouvea et al., 1990
aFT-9	CTAGATACTACAACACTAC	G9	306pb	Gouvea et al., 1990
FT5	CATGTACTCGTTGTTACGTC	G5	780 pb	Gouvea et al., 1994
DT-6	CTAGTTCCTGTGTAGAATC	G6	500 pb	Gouvea et al., 1994
HT-8	CGGTTCCGGATTAGACAC	G8	274 pb	Gouvea et al., 1994
ET-10	TTCAGCCGTTGCGATTC	G10	715 pb	Gouvea et al., 1994

Quadro 1. Seqüência dos *primers* utilizados e tamanhos dos fragmentos obtidos (pb) em *semi-nested* RT-PCR para determinação de genotipos G de rotavírus (*amplifica todos os genotipos).

<i>Primer</i>	Posição	Seqüência de nucleotídeos (5' - 3')	Sorotipos e Genotipos	Tamanhos	Referências
Con3	11-32	TGGCTTCGCTACTTTATAGACA	Comum*	876 pb	Gentsch et al., 1992
Con2	868-887	ATTTCGGACCACTTATAACG	Comum*	876 pb	Gentsch et al., 1992
2T-1	474-494	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	[4]	483 pb	Gentsch et al., 1992
1T-1	339-356	TCTACTTGGATAACGTGT	[8]	345 pb	Gentsch et al., 1992

Quadro 2. Seqüência dos *primers* e tamanhos dos fragmentos obtidos (pb) em *semi-nested* RT-PCR para determinação do genotipos P em amostras de rotavírus (*amplifica todos os genotipos).

4 RESULTADOS

Do total de 328 amostras de fezes de humanos recebidas, 98 foram identificadas como positivas para rotavírus em EGPA (29,8%). Dentre essas, 96 apresentaram o padrão de migração de bandas 4-2-3-2, característico de rotavírus do grupo A (Figura 3A). As duas outras amostras positivas foram classificadas como pertencentes ao grupo C de rotavírus, com o padrão de migração de bandas 4-3-2-2 (Figura 3B).

Todas as amostras positivas em EGPA para rotavírus do grupo A (EGPA+), mais outras 96 amostras negativas em EGPA (EGPA-) foram ensaiadas pelo teste de *semi-nested* RT-PCR, resultando em 142 ou 73,9% de amostras positivas para rotavírus.

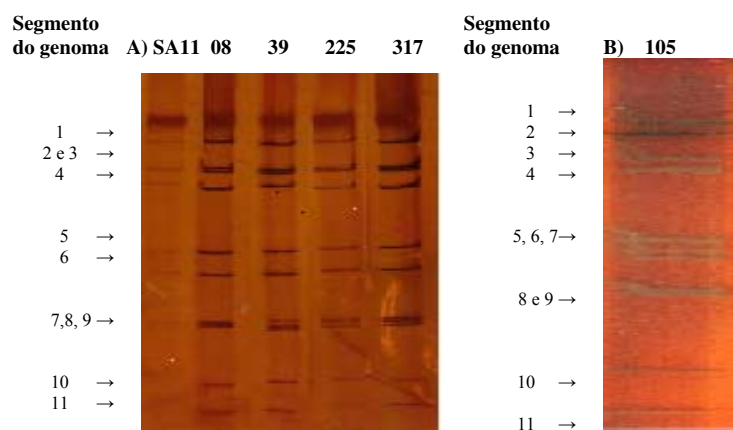


Figura 3. Gel de poliacrilamida a 7,5% de RNA de rotavírus detectados em amostras de fezes de humanos, coletadas em Campinas, nos anos de 2003 (amostras 08 e 39) e 2004 (amostras 225, 317 e 105). **A)** Padrão de bandas característico do grupo A de rotavírus. **B)** Padrão de bandas característico do grupo C de rotavírus.

No ano de 2003 o número de amostras de fezes coletadas foi pequeno (38), já que a coleta se deu somente na fase final do surto que vinha ocorrendo naquele ano. No entanto, pode-se considerar que as frequências de identificação de rotavírus ainda foram altas, com 34,2%

das amostras positivas. Nos dois meses em que foram coletadas amostras, ou seja, setembro e outubro, 40,7% e 18,2%, respectivamente, foram positivas para rotavírus (Tabela 1).

De acordo com dados do CEPAGRI (<http://orion.cpa.unicamp.br>) a temperatura média na cidade de Campinas nos meses de setembro e outubro é de 21,6°C e 23,3°C, respectivamente. Quanto à umidade relativa do ar, o mês de setembro possui variação, ao longo do dia, entre 68,5% e 45,9%, enquanto que no mês de outubro a variação é de 69,7% a 46,6%. Além disso, o mês de setembro possui média de oito dias de chuva, enquanto que no mês de outubro a média é de 10 dias.

Tabela 1. Resultados dos testes de eletroforese em gel de poliacrilamida para rotavírus em amostras de fezes de humanos, coletadas na cidade de Campinas, SP em surto de rotavirose em 2003.

Mês	Número de amostras testadas	Números e porcentagens (%) de amostras positivas
Setembro	27	11 (40,7)
Outubro	11	2 (18,2)
Total	38	13 (34,2)

No ano de 2004, amostras de fezes de humanos foram coletadas entre agosto e novembro, período no qual ocorreu um novo surto de rotavirose na cidade de Campinas. Como demonstrado na Tabela 2, rotavírus foram identificados em maior frequência nos meses de agosto e setembro, com 33,3 e 37,4% de positividade, respectivamente. Já nos meses seguintes, outubro e novembro, apenas uma dentre 39 e uma dentre 15 amostras analisadas, respectivamente, foram positivas para rotavírus.

Os dados do CEPAGRI indicam que na cidade de Campinas o mês de agosto possui temperatura média de 20,5°C, apresenta média de três dias com chuva e variação da umidade relativa do ar ao longo do dia entre 66,6% e 37,1%. Já o mês de novembro possui temperatura média de 24°C, 12 dias com chuva e umidade relativa do ar com variações entre 70,7% e 40,3%.

Tabela 2. Resultados dos testes de eletroforese em gel de poliacrilamida para a pesquisa de rotavírus em amostras de fezes de humanos, coletadas na cidade de Campinas, SP em surto de rotavirose em 2004.

Mês	Número de amostras testadas	Números e porcentagens (%) de amostras positivas
Agosto	39	13 (33,3)
Setembro	187	70 (37,4)
Outubro	39	1 (2,6)
Novembro	15	1 (6,7)
Total	290	85 (29,3)

Testes de genotipagem para rotavírus foram realizados nas 96 amostras positivas em EGPA para rotavírus do tipo A (EGPA+) e em outras 96 amostras negativas em EGPA (EGPA-). Para compor o grupo de amostras EGPA- foram escolhidas, aleatoriamente, 13 amostras de fezes provenientes do surto de 2003 e 83 daquelas obtidas em 2004.

Utilizando, na reação de RT-PCR, os *primers* consenso Beg-9/End-9, e na reação de *semi-nested* PCR o conjunto de *primers* End-9 + Mix G-I ou Beg-9 + Mix GII, o objetivo foi amplificar e identificar as variantes do segmento genômico responsável pela codificação da glicoproteína VP7, ou genótipos G, dos rotavírus em circulação nos períodos estudados. Já os *primers* consenso Con2 200nM/ Con3 (RT-PCR) e o conjunto de *primers* Con2 200nM +1T-1 + 2T-1 (*semi-nested* PCR), foram utilizados para detectar as variantes do segmento

genômico que codifica para a VP4. Nesse caso, foram utilizados apenas *primers* para os genótipos P mais frequentemente identificados em rotavírus associados às infecções em humanos, ou seja, os genótipos P[4] e P[8].

A produção de cDNA e a primeira reação de amplificação foram efetuadas para todas as 192 amostras. Os resultados obtidos na genotipagem das amostras estão dispostos nas Tabelas 3 a 5. Do total de amostras de fezes de humanos analisadas em *semi-nested* RT-PCR, em 134 delas foi possível identificar o genótipo de rotavírus. Dentre as amostras positivas nesse teste, 88 provinham do grupo EGPA+ e 46 do grupo EGPA- .

A análise estatística dos resultados obtidos com os dois testes diagnósticos para a identificação de rotavírus mostra que a *semi-nested* RT-PCR, apresentou maior sensibilidade que a EGPA ($\chi^2 = 67,06$, valor-p= 0,000 e Kappa= 0,52).

Tabela 3. Distribuição de genótipos de rotavírus em fezes de humanos positivas para rotavírus, coletadas na cidade de Campinas, SP durante o período de setembro e outubro de 2003.

Genótipo	Nº Amostras		Total	
	EGPA +	EGPA-	n	%
G1P[8]	6	4	10	34
G3P[8]	3	1	4	15
G9P[8]	0	2	2	7,8
G5P[8]	2	0	2	7,8
G3	0	1	1	3,9
G3P[4]	0	1	1	3,9
G2P[4]	1	0	1	3,9
Mista	1	0	1	3,9
Não Genotipadas	0	-----	0	0
Negativas em <i>semi-nested</i> RT-PCR	-----	4	4	15
Total	13	13	26	

Tabela 4. Distribuição de genótipos de rotavírus em fezes de humanos positivas para rotavírus, coletadas na cidade de Campinas, SP durante o período de agosto a novembro de 2004.

Genótipo	Nº Amostras		Total	
	EGPA+	EGPA-	n	%
G3P[8]	20	11	31	18,7
G9P[8]	14	9	23	13,9
G1P[8]	12	2	14	8,4
G5P[8]	1	9	10	6
G4P[8]	9	0	9	5,4
G3	3	2	5	3
G6	1	2	3	1,8
G2P[4]	1	1	2	1,2
G2P[4]	1	1	2	1,2
G2P[8]	1	1	2	1,2
G9P[4]	2	0	2	1,2
G1P[4]	1	0	1	0,6
G3P[4]	1	0	1	0,6
G8P[8]	1	0	1	0,6
G9	1	0	1	0,6
Mistas	7	0	7	8,4
Não Genotipadas	8	-----	8	4,8
Negativas em <i>semi-nested</i> RT-PCR	-----	46	46	28
Total	83	83	166	

Tabela 5. Distribuição de genótipos de rotavírus em fezes de humanos positivas para rotavírus, coletadas na cidade de Campinas, SP durante o período de setembro e outubro de 2003 e agosto a novembro de 2004.

Ano	2003		2004	
Genótipo	%	n	%	n
G1P[4]	0	0	0,6	1
G1P[8]	38,4	10	8,4	14
G2P[4]	3,9	1	1,2	2
G2P[8]	0	0	1,2	2
G3	3,9	1	3,0	5
G3P[4]	3,9	1	0,6	1
G3P[8]	15,4	4	18,7	31
G4P[8]	0	0	5,4	9
G5P[8]	7,8	2	6,0	10
G6	0	0	1,8	3
G8P[8]	0	0	0,6	1
G9	0	0	0,6	1
G9P[4]	0	0	1,2	2
G9P[8]	7,8	2	13,9	23
Mistas	3,9	1	4,2	7
Não Genotipadas	-	-	4,8	8
Negativas em <i>semi-nested</i> RT-PCR	15,4	4	27,7	46
Total		26		166

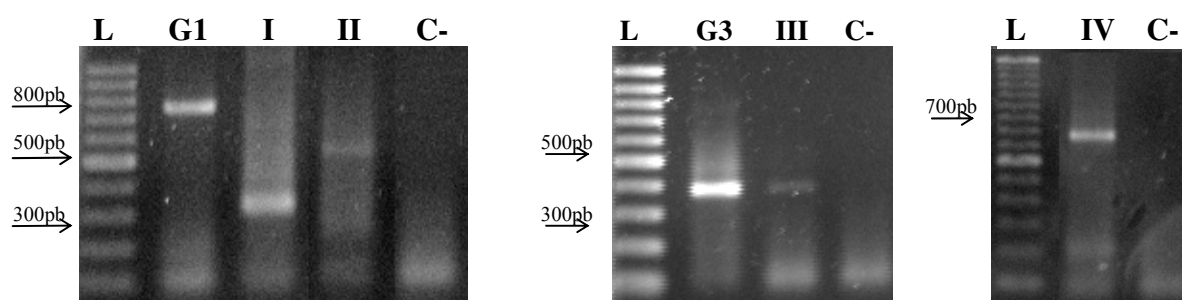


Figura 4. Gel de agarose a 1,5% para rotavírus submetidos à genotipagem G pela reação de *semi-nested* RT-PCR. **L:** padrão de peso molecular de 100pb; **G1:** controle positivo para genótipo G1; amostra hp01, amplificado de 749pb. **G3:** controle positivo para genótipo G3 (amostra 3955) amplificado de 374pb. **C-:** controle negativo (H_2O DEPC). **Canaleta I:** amplificado de 306pb, genótipo G9. **Canaleta II:** amplificado de 583pb, genótipo G4. **Canaleta III:** amplificado de 374 pb, genótipo G3. **Canaleta IV:** amplificado de 652pb, genótipo G2.

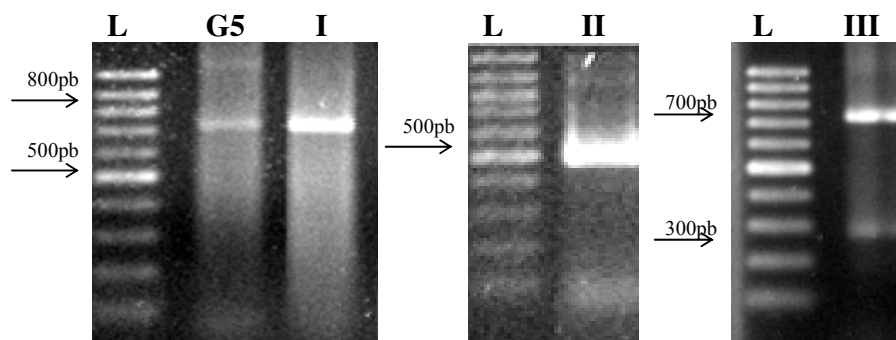


Figura 5. Gel de agarose a 1,5% para rotavírus submetidos à genotipagem G pela reação de *semi-nested* RT-PCR. **L:** padrão de peso molecular de 100pb; **G5:** controle positivo para genotipo G5 (amostra 3949) amplificado de 780pb. **Canaleta I:** amplificado de 780pb, genotipo G5. **Canaleta II:** amplificado de 500pb, genotipo G6. **Canaleta III:** amplificados de 780pb e 274pb, genotipos G5 e G8, respectivamente.

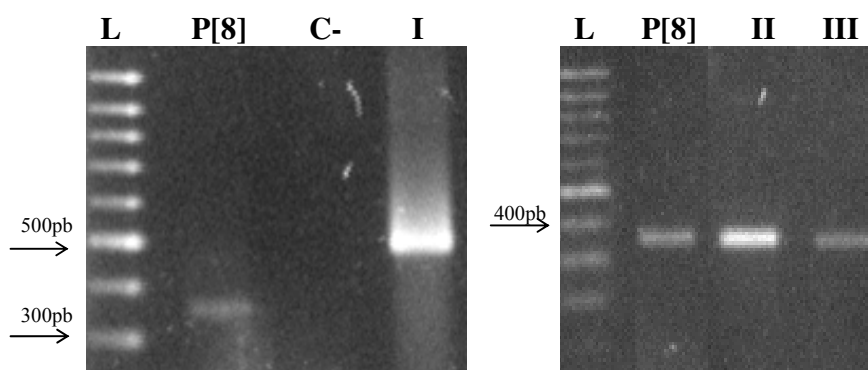


Figura 6. Gel de agarose a 1,5% para rotavírus submetidos à genotipagem P pela reação de *semi-nested* RT-PCR. **L:** padrão de peso molecular de 100pb; **P[8]:** controle positivo para genotipo P[8] (amostra Wa), amplificado de 345pb. **C-:** controle negativo (H₂O DEPC). **Canaleta I:** amplificado de 483pb, genotipo P[4]. **Canaletas II e III:** amplificados de 345pb, genotipo P[8].

A análise dos genotipos de rotavírus identificados em fezes de humanos, provenientes da cidade de Campinas, mostra que, no ano de 2003 (Tabelas 3 e 5), nas 26 amostras testadas (13 delas do grupo EGPA+ e as outras 13 do grupo EGPA-) ocorreu a predominância de amplicons com aproximadamente 750pb, ou seja, equivalente ao genotipo G1 (Figura 4) e 345pb, ou seja, genotipo P[8] (Figura 6). O genotipo G1P[8] estava presente em 38,4% das amostras (n=10), sendo seis delas do grupo EGPA+ e as quatro restantes do grupo

EGPA- (Tabela 3). O segundo genotipo mais abundante em 2003 foi G3P[8] [amplicons com aproximadamente 375pb para genotipo G (Figura 4) e 345pb para genotipo P (Figura 6)], presente em 15,4% das amostras testadas (n=4) (Tabela 3). Nesse caso foram três amostras do grupo EGPA+ e uma do grupo EGPA- (Tabela 3). Outros genotipos menos frequentes foram identificados: duas amostras G5P[8] [amplicons de 780pb em genotipagem G (Figura 5)] e duas amostras G9P[8] [amplicon de 306pb em genotipagem G (Figura 4)], presentes em 7,8% das amostras testadas (Tabela 3). Outros genotipos foram identificados em apenas 3,9% das amostras testadas (n=1): G2P[4] [amplicons de 652pb em genotipagem G (Figura 4) e 483pb em genotipagem P (Figura 6)] (Tabela 3), G3P[4] e G3 (Tabela 3). Em uma amostra de fezes foram detectados, simultaneamente, dois amplicons para genotipos G de tamanhos diferentes: um próximo de 750pb e outro próximo de 270pb, caracterizando a ocorrência dos genotipos G1 e G8, ou seja, uma infecção mista (Tabela 3). Tanto nessa amostra, como naquela considerada como G3, não foi possível identificar a variante de VP4 (genotipo P).

Das 290 amostras de fezes de humanos coletadas no ano de 2004 (Tabelas 4 e 5), 166 delas foram submetidas à genotipagem G e P: 83 amostras do grupo EGPA+ e 83 amostras do grupo EGPA-. Nessas amostras foram detectados amplicons de outras variantes para o segmento genômico para codificação da proteína VP7, não identificados nas amostras de 2003. Entre esses exemplos estão genotipos como G6 [amplicon de 500pb (Figura 5)], presente em 1,8% das amostras (n=3; Tabelas 4 e 5); G4P[8] [amplicon para genotipo G de aproximadamente 580pb (Figura 4)] presente em 5,4% das amostras (n=9; Tabelas 4 e 5) e G8P[8] [amplicon para genotipo G de aproximadamente 270pb (Figura 5)] presente em 0,6% das amostras (n=1; Tabelas 4 e 5). Também, apenas nas amostras de 2004 foi possível a detecção dos genotipos G1P[4] (0,6%), G2P[8] (1,2%), G9 (0,6%) e G9P[4] (1,2%) (Tabelas 4 e 5).

Nessas amostras de 2004 o genotipo G3P[8] aparece como o mais freqüente, presente em 31 amostras (18,7%) (Tabela 4 e 5), sendo vinte amostras do grupo EGPA+ e onze do grupo EGPA-. O genotipo G9P[8] aparece como o segundo mais abundante (13,9%) (Tabela 4), identificado em 23 amostras: quatorze do grupo EGPA+ e nove do grupo EGPA-. Em seguida aparecem os genotipos G1P[8], presente em 8,4% das amostras (n=14: doze amostras do grupo EGPA+ e duas do grupo EGPA-); G5P[8] para 6,0% das amostras (n=10: uma amostra do grupo EGPA+ e nove do grupo EGPA-) e G4P[8] identificado em 5,4% das amostras (n=9 amostras, todas do grupo EGPA+) (Tabela 4). Também, foi possível a identificação de sete infecções mistas (4,2%): duas com os genotipos G1 e G2, G2 e G3 e G3 e G5 e uma com os genotipos G5 e G8 (Tabela 4). Do total das amostras coletadas em 2004 e submetidas à *semi-nested* RT-PCR, oito amostras EGPA+ (4,8%) não reagiram com nenhum dos iniciadores utilizados (Tabela 4).

As proporções de identificação do genotipo G1P[8] em 2003 e 2004 foram analisadas pelo teste de duas proporções. Os valores obtidos foram $Z = 3,07$ e valor- $p = 0,002$, indicando que a proporção do genotipo G1P[8] em 2003 (38,4%) foi significativamente maior do que em 2004 (8,4%).

As amostras de fezes analisadas nesse estudo nos foram encaminhadas por Unidades de Saúde localizadas em diferentes regiões da cidade de Campinas: norte, sul, leste, noroeste e sudoeste (Figuras 7 e 8).

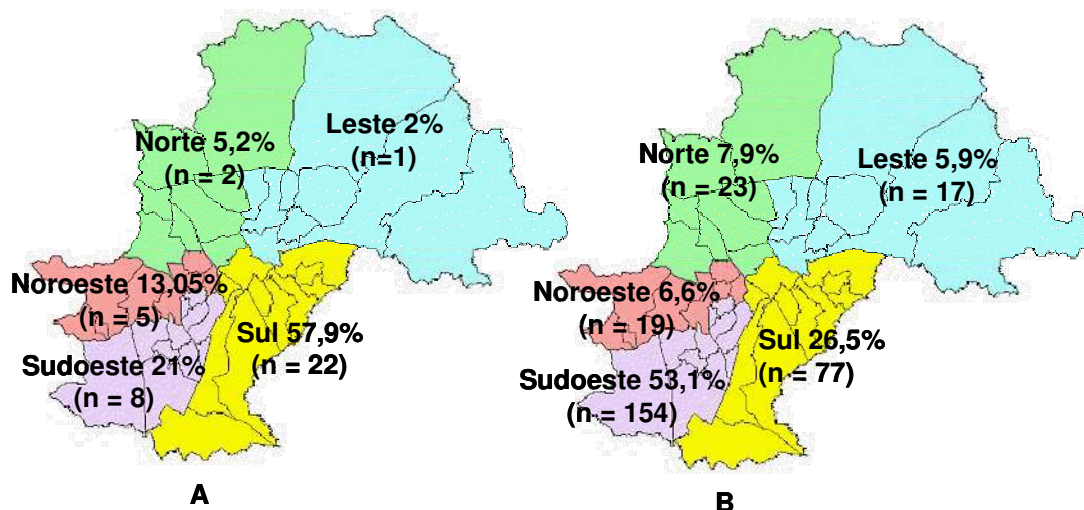


Figura 7. Regiões geográficas da cidade de Campinas, SP. Porcentagens e números de amostras de fezes de humanos encaminhadas por cada região no período de setembro e outubro de 2003 (A) e agosto a novembro de 2004 (B).

Das 328 amostras de fezes analisadas nos dois anos de estudo para a presença de rotavírus, 49,3% (n=162) eram provenientes da região Sudoeste e 30,2% (n=99) da região Sul. As Unidades de Saúde da região Noroeste enviaram 24 amostras (7,3%), as da região Norte enviaram 25 amostras (7,6%) e as da região Leste enviaram 18 amostras (5,5%) (Figura 7).

No ano de 2003, trinta e oito amostras foram encaminhadas ao laboratório e 26 delas foram testadas em EGPA e em *semi-nested* RT-PCR. Desse total, 16 amostras foram encaminhadas pelas Unidades de Saúde localizadas na região Sul de Campinas (61,5%). As Unidades de Saúde da região Sudoeste foram responsáveis pelo encaminhamento de 27% das amostras submetidas aos dois testes, enquanto das regiões Norte e Noroeste vieram 8% e 4%, respectivamente. Nenhuma amostra encaminhada pela região Leste foi submetida à reação de *semi-nested* RT-PCR. Analisando a região de origem das amostras e os genótipos identificados, observa-se a detecção de diferentes genótipos na região Sul e Sudoeste e de um único genótipo

(G3P[8]) na região Norte. A única amostra oriunda da região Noroeste apresentou-se como negativa para rotavírus nos dois testes utilizados (Figura 8A).

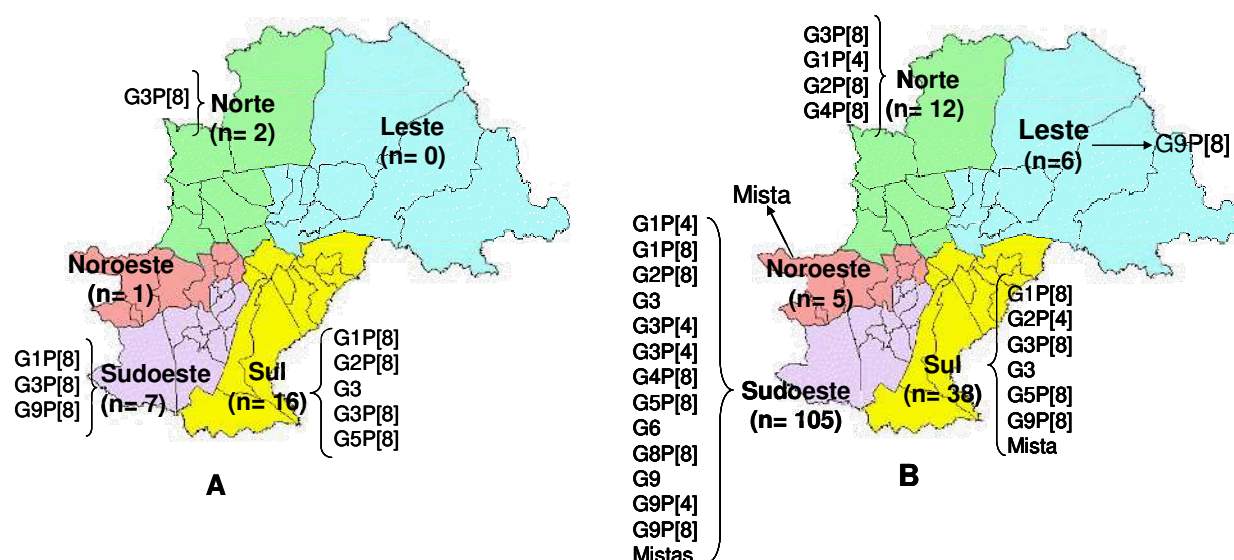


Figura 8. Distribuição de genótipos de rotavírus nas diferentes regiões da Cidade de Campinas, SP identificados em amostras de fezes de humanos (A: ano de 2003; B: ano de 2004).

No ano de 2004 foram encaminhadas para análise 290 amostras de fezes, sendo que 166 delas foram submetidas aos dois testes para a detecção de rotavírus, ou seja, EGPA e *semi-nested* RT-PCR. Desse total, 105 amostras eram provenientes de Unidades de Saúde da região Sudoeste (63,3%), enquanto que a região Sul representa a origem de 38 dessas amostras (22,9%). A região Norte aparece como a origem de 7,2% das amostras (n=12), seguida por seis amostras originárias da região Leste (3,6%) e cinco amostras provenientes da região Noroeste (3%). Analisando a região de origem das amostras e os genótipos identificados, observa-se a detecção de diferentes genótipos na regiões Sul, Sudoeste e Norte, com maior variabilidade na região Sudoeste. Um único genótipo foi identificado na região Leste (G9P[8]), além de uma infecção mista na região Noroeste (G2 e G3, com P[8]) (Figura 8B).

De acordo com os dados do Censo de 1996 e o Índice de Condição de Vida (ICV) de 2001 (Tabelas 6 e 7; <http://tabnet.saude.campinas.sp.gov.br>) na cidade de Campinas, a região Leste possui 23,05% da população, coeficiente médio de mortalidade infantil (CMM) entre 6,0 e 17,3 casos para cada 1000 nascidos vivos, coeficiente médio de desnutrição (CMD) entre 7,9 e 148,7 casos para cada 10.000 habitantes. Na maior parte da região, 19 a 55% dos chefes de família possuem renda mensal superior a 10 salários mínimos (RM). A região Norte é a quarta mais populosa, possui CMM entre 8,0 e 25,0, CMD entre 6,6- 77,6 e RM entre 19 e 55%. Já a região Noroeste possui CMM entre 9,9 e 16,7 e CMD entre 72,7 e 168,7 e RM entre 0 e 5%, porém, é a região com menor população (9,76%). A região Sul, possui CMM entre 7,66 e 16,7, CMD entre 58,3- 132,8 e RM com dois intervalos diferentes: um entre 0 e 5 % e, parte da região com intervalos entre 19 e 33%. Além disso, é a região mais populosa da cidade (25,16%). Já a região Sudoeste é a segunda mais populosa da cidade (23,98%), possui CMM entre 7,7 e 15,8, CMD entre 38,6 e 148,7 e RM entre 0 e 5% (Tabelas 6 e 7)

Tabela 6. Distribuição Relativa da População Total (%) por região geográfica da cidade de Campinas, SP, no ano de 1996.

Região Geográfica	Distribuição Relativa da População Total
Ano	1996
Leste	23,05
Sul	25,16
Norte	18,05
Sudoeste	23,98
Noroeste	9,76

Fonte: CENSO, 1996

Tabela 7. Coeficiente médio de mortalidade infantil (CMM), coeficiente médio de desnutrição em crianças com idade inferior a cinco anos (CMD) e porcentagem de chefes de família com renda mensal inferior a 10 salários mínimos por região geográfica da cidade de Campinas, SP.

Região	CMM (nº/ 1000 nascidos vivos)	CMD (nº/ 10 000 hab)	RM (%)
Leste	6,0- 17,3	7,9-148,7	19- 55
Sul	7,66- 16,7	58,3- 132,8	0-5 ou 19-33
Norte	8,0- 25,0	6,6- 77,6	19- 55
Sudoeste	7,7- 15,8	38,6- 148,7	0- 5
Noroeste	9,9- 16,7	72,7- 168,7	0- 5

Fonte: ICV, 2001

5 DISCUSSÃO

Os rotavírus são agentes de gastroenterites agudas com distribuição mundial e estão associados a casos de morbidade e mortalidade em crianças, principalmente nos países em desenvolvimento (WILHELM et al., 2003). Esses vírus seriam responsáveis por, em média, 33,% dos casos de gastroenterites agudas que pressupõem internação (COOK et al., 1990), por 20 a 25% do total de óbitos por doença diarreica e por 6% da mortalidade global entre crianças com idade inferior a cinco anos (PARASHAR et al., 2006).

No Brasil, a notificação compulsória para casos de diarreia ocorre quando do aparecimento de surtos com esse sinal clínico. No estado de São Paulo, a vigilância epidemiológica da diarreia aguda é feita desde 2000 por um programa, denominado Monitoração da Doença Diarreica Aguda (MDDA). Na cidade de Campinas este programa foi implementado a partir de julho de 2004 quando da ocorrência de um surto de diarreia no município. Naquele ano foram registrados 3.250 casos de diarreia (CÉSAR et al., 2005) e foi desses casos que amostras de fezes foram encaminhadas para o Laboratório de Virologia da Unicamp para o diagnóstico de rotavírus.

No Brasil a vigilância para rotavírus tem sido realizada em vários estados da confederação desde 1982, e, mais recentemente, com maior ênfase para a identificação de genotipos dos vírus circulantes, o que pode contribuir para o estabelecimento de estratégias para o atual processo de vacinação ou para o desenvolvimento de novas vacinas (SANTOS & HOSHINO, 2005).

Em razão dos altos índices de mortalidade e morbidade associados às infecções por rotavírus, a vacinação de crianças entre seis a 24 semanas de idade visa, principalmente, evitar os sintomas da doença, sem necessariamente impedir a infecção (ESTES, 1996, OLIVEIRA & LINHARES, 1999; PARASHAR et al., 2006). Para a construção das vacinas para a rotavirose diferentes estratégias já foram propostas, com a inclusão de genótipos ou sorótipos de rotavírus diferentes. No entanto, em todas elas há a inclusão do genótipo G1 por ser aquele de maior circulação mundial e estar associado a um número maior de casos de gastroenterites (BRESEE et al., 2005; MONTENEGRO et al., 2007). Com a vacinação universal para a rotavirose implantada no Brasil em 2006, com uma vacina oral (VORH-Ministério da Saúde, 2005) contendo amostra de rotavírus de humanos genótipo G1P[8], o monitoramento dos casos de diarreia aguda precisa ser intensificado, bem como aquele da circulação e presença de genótipos de rotavírus a eles associados. Dessa forma será possível verificar pela eficiência da vacinação e também se haverá ou não mudanças importantes na frequência com que os genótipos de rotavírus aparecem.

Por outro lado, sabe-se que crianças naturalmente infectadas por rotavírus ou aquelas vacinadas com vacina oral, portanto com vírus atenuados, desenvolvem resposta imune do tipo humoral que protege contra a doença severa quando de reinfecções. As vacinas induzem a formação de imunoglobulinas (Ig) das classes G (IgG) e A (IgA). As IgA reagiriam contra diferentes genótipos de rotavírus no nível intestinal. Há, no entanto, muitas controvérsias se os anticorpos séricos efetivamente protegem contra a infecção e quais seriam os outros mecanismos envolvidos na imunidade. Em revisão organizada por JIANG et al. (2002), uma das questões ainda colocada diz respeito ao tipo de resposta humoral, se homo ou heterotípica, ou seja, a infecção por um determinado genótipo induziria proteção cruzada para outros genótipos, ou

somente para o genotipo específico? Haveria a necessidade de anticorpos intestinais para a efetiva proteção? Como atuariam os mecanismos celulares na resposta à infecção pelos rotavírus? De acordo com esses autores, anticorpos séricos têm papel importante na proteção à infecção, mas a presença de imunoglobulinas espécie-específicas ou genotipo específicas seriam fundamentais na mucosa intestinal para evitar a ligação vírus-célula. Sabendo-se que os principais mecanismos associados à evolução dos rotavírus seriam o acúmulo de mutações pontuais e o *shift* genético ou *reassortment*, onde há troca de material genético entre os vírus quando de infecções mistas (KANG et al., 2005), prevê-se contínua vigilância epidemiológica para as infecções por rotavírus (SANTOS & HOSHINO, 2005).

Em Campinas, localizada na região sudeste do Estado de São Paulo, nos anos de 2003 e 2004 ocorreram dois surtos de diarreia associados a rotavírus, a partir de agosto daqueles anos e que se estenderam por 3 a 4 meses. Apesar do número pequeno de amostras coletadas no ano de 2003 (n=38), pode-se considerar que as frequências de identificação de rotavírus ainda foram altas nos meses de setembro (40,7%) e outubro (18,2%) (Tabela 1). O pequeno número de amostras analisado é justificável uma vez que as amostras nos foram remetidas já na fase final do surto de diarreia ocorrido. É importante salientar que os índices ainda altos de identificação eram esperados já que a coleta de fezes foi direcionada para casos com presença de diarreia e suspeita de rotavirose e o surto ainda se mantinha na cidade de Campinas.

No ano de 2004, a Secretaria Municipal de Saúde de Campinas, em razão do surto de rotavirose ocorrido no ano anterior, montou estratégias de notificação para os casos de diarreia. Ao mesmo tempo, atenção foi dada para a coleta de amostras de fezes de indivíduos com sintomas de diarreia. Como consequência, foram notificados 3250 casos de suspeita de diarreia,

segundo CÉSAR et al., 2005 e 3644 segundo a Secretaria de Saúde Municipal de Campinas (www.campinas.sp.gov.br). Já a partir de agosto daquele ano, houve a coleta de amostras de fezes que foram encaminhadas para a detecção de rotavírus.

Rotavírus do grupo A foram os mais freqüentes, tanto no surto de 2003 como no de 2004, tendo sido identificados em 97,9% do total de amostras positivas para rotavírus em EGPA. Desde as primeiras descrições dos rotavírus, há três décadas atrás, o grupo A caracteriza-se como aquele mais freqüente em humanos (SANTOS & HOHINO, 2005). Estima-se que no mundo todo esse grupo seja responsável por, aproximadamente, 95% dos casos de infecção por rotavírus (PIETRUCHINSKI et al., 2006). Sendo assim, o grupo A de rotavírus aparece como o grupo mais associado a doenças (como gastroenterites graves), provocando, anualmente, em todo o mundo, média de 440 mil mortes de crianças com idade inferior a cinco anos (PARASHAR et al., 2003). Os grupos B e C de rotavírus, também detectados em humanos (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996), não apresentam importância epidemiológica ao redor do mundo, com exceção da China, onde o grupo B aparece associado com episódios de diarreia aguda em idosos (SANTOS & HOSHINO, 2005).

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que, para o ano de 2004, agosto e setembro foram os meses com maior incidência de rotavírus, com 33,3 e 37,4% das amostras positivas (Tabela 2). Sabe-se que a rotavirose tem características epidemiológicas distintas em áreas de clima temperado e em áreas tropicais. Enquanto nas primeiras a infecção é tipicamente sazonal, com epidemias nos meses frios, nas regiões tropicais a sazonalidade não é característica, com manifestações de caráter endêmico, esporádico ou em surtos. No Brasil há duas configurações distintas para as infecções por rotavírus, com o centro-oeste e sudeste/sul do país com um perfil sazonal, com maior incidência nos meses mais secos (maio a setembro). Nas

regiões Norte/Nordeste não há claramente uma sazonalidade (PEREIRA et al., 1993; LINHARES, 2000). De acordo com o Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas aplicadas à Agricultura (CEPAGRI: <http://orion.cpa.unicamp.br>) os meses de agosto e setembro caracterizam-se como os períodos mais secos em Campinas (três a oito dias de chuva), o que favoreceria a permanência e disseminação dos rotavírus no ambiente. Por essa razão, observar-se-ia a maior concentração de casos de infecções por rotavírus nesse período. Após o mês de outubro o clima na cidade torna-se mais úmido, com maior concentração de chuvas, 12 dias no mês de novembro, por exemplo, o que determinaria pela queda no número de casos de diarreia por rotavírus dado a diminuição na transmissão.

Como relatado na revisão de SANTOS & HOSHINO (2005), há flutuações geográficas e temporais na distribuição dos rotavírus em vários países. Foi possível verificar que para uma determinada região, um determinado genotipo de rotavírus pode ter uma flutuação anual. Ainda, em um mesmo ano, em um único país, porém em regiões diferentes, os genotipos circulantes podem ser também diferentes. E, o que é mais comum, muitos genotipos estão em circulação na mesma região no mesmo período. A caracterização dos genotipos de rotavírus em circulação torna-se importante para a definição de estratégias de vacinação. Para isso, a técnica de *semi-nested* RT-PCR é amplamente utilizada, já que possui alta sensibilidade e especificidade na identificação de cada um dos genotipos virais. Essa metodologia permite estudar os genotipos circulantes tanto sob o aspecto de sua distribuição geográfica, quer quando esses vírus estão associados a surtos ou endemias, ou seja, a sua distribuição temporal, e tem fornecido informações valiosas sobre a diversidade dos vírus circulantes em todo o mundo. Os genotipos de rotavírus mais frequentemente associados a doenças em humanos são G1, G2, G3 G4, P[4] e P[8], além das combinações G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] (ESTES, 2001; CASTELLO et al.,

2004; SANTOS & HOSHINO, 2005). Estudos em todo o mundo apontam os genótipos G1 a G4 como os mais frequentes em humanos e, portanto os mais associados a doenças (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996). Além disso, as combinações G1P[8], G2P[4], G3P[8] e G4P[8] aparecem em 85,5% dos casos de diarreia em crianças com idade inferior a cinco anos. A partir dos anos 1990, estudos realizados em diferentes países do mundo identificam cepas de rotavírus com o genótipo G9. Atualmente, esse genótipo é encontrado em frequência cada vez maior, caracterizando-se como genótipo emergente e o quinto mais abundante em todo o mundo (SANTOS & HOSHINO, 2005; BERNSTEIN, 2006).

Os quatro genótipos mundialmente mais frequentes (G1 a G4) representam mais de 90% das infecções por rotavírus em locais como a América do Norte, Europa e Austrália. Porém, em locais como a América do Sul e a Ásia, esses genótipos estão associados a apenas 68% das infecções, enquanto que na África, essa taxa é menor que 50% (SANTOS & HOSHINO, 2005). Sendo assim, combinações pouco comuns no resto do mundo podem, regionalmente, possuir grande importância epidemiológica. Na África, combinações incomuns de G e P, como o genótipo G8P[6], representam 27% das infecções por rotavírus, enquanto que, na América do Sul, genótipos incomuns representam 11% dos casos de infecção sendo, muito comum, por exemplo, a detecção do genótipo G5, principalmente no Brasil e Argentina.

No Brasil, desde 1982 são feitos estudos da caracterização de sorótipos de rotavírus circulantes em diversas regiões do país e o genótipo G1P[8] aparece como o mais prevalente (TIMENETSKY et al., 1994; LINHARES, 2000; SANTOS et al., 2003). Contudo, estudos mais recentes, conduzidos nas cidades do Rio de Janeiro, Salvador, Ponta Grossa e São Paulo, reportam o expressivo crescimento do genótipo G9P[8] (SANTOS et al., 2005; PIETRUCHINSKI et al., 2006; VOLOTÃO et al., 2006; CARMONA et al., 2006).

No presente trabalho, durante os dois anos em estudo, os quatro genótipos de rotavírus mais comuns no mundo todo (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8]), também foram detectados em amostras de fezes de humanos na cidade de Campinas, SP. Em 2003, o genótipo G1P[8] aparece como o mais freqüente (38,4%), ocorrendo, também, a detecção dos genótipos G3P[8] (15,4%), G9P[8] (7,8%) e G2P[8] (3,9%) (Tabela 5). Porém, genótipos incomuns ao redor do mundo, como G5P[8], aparecem também na cidade de Campinas, e como o terceiro genótipo mais freqüente em 2003, presente em 7,8% das amostras (Tabela 5). Em 2004, os genótipos de rotavírus mais comuns em todo o mundo também foram detectados, destacando-se a presença do genótipo G3P[8] como o mais freqüente. Além disso, o genótipo mundialmente emergente, G9P[8], aparece como o segundo mais freqüente (13,9%) e em porcentagem superior ao ano de 2003 (7,8%) (Tabela 5). Já o genótipo G1P[8] apresenta taxa de detecção muito inferior ao ano de 2003, caracterizando-se, em 2004, como o terceiro genótipo mais freqüente e presente em apenas 8,4% das amostras (Tabela 5). Essa diferença foi estatisticamente significativa ($Z= 3,07$; valor- $p=0,002$), sugerindo a substituição, em 2004, do genótipo G1P[8] pelos genótipos G3P[8] e G9P[8]. Em geral, um determinado genótipo de rotavírus predomina ao longo de um ou dois anos, sobrevivendo a emergência de uma nova variedade, possivelmente como resultado da “pressão” exercida pelo número de indivíduos imunes na comunidade (OLIVEIRA & LINHARES, 1999).

O desenvolvimento e a utilização de técnicas como a RT-PCR diminuiu o número de amostras não genotipadas. No entanto, em geral, dependendo da amostragem, de 16 a 65% dos rotavírus presentes em amostras de fezes podem não ser genotipados. Mesmo quando se utiliza a combinação de diferentes testes de genotipagem (como EIA, RT-PCR e hibridização), de 7,6% a 26,6% das amostras não têm seus genótipos identificados. Nesse trabalho, entre as

amostras do grupo EGPA+, ou seja, amostras onde foi comprovada a presença de rotavírus, 8,4% não foram genotipadas. Esse fato indica que essas amostras podem ter genótipos não identificados pelos Mix-GI, Mix-GII ou Mix P. Amostras não genotipadas também podem representar tipos não comuns, genótipos novos ou, ainda, cepas com variações genéticas no sítio de ligação dos *primers*. Estudos mais detalhados sobre essas amostras podem aprofundar o entendimento sobre os aspectos epidemiológicos e a evolução desses vírus (SANTOS & HOSHINO, 2005).

No presente estudo, a genotipagem pela *semi-nested* RT-PCR foi realizada em amostras do grupo EGPA- e EGPA+. A inclusão de 96 amostras pertencentes ao segundo grupo foi fundamental para a caracterização dos genótipos circulantes nos dois anos de estudo. No ano de 2003, somente no grupo de amostras EGPA- foi detectada a presença dos genótipos G3, G9P[8] e G3P[4] e, em 2004, o genótipo G5P[8] concentra-se em amostras desse grupo, o que permitiu sua caracterização como o quarto genótipo mais comum.

Além de promover a identificação dos genótipos circulantes, a *semi-nested* RT-PCR apresenta maior sensibilidade na detecção da presença de rotavírus em fezes de humanos quando comparada com os resultados obtidos em EGPA. Nesse trabalho, a técnica mais sensível apresentou 73,9% de positividade enquanto que a EGPA apresentou 50% de positividade para a detecção de rotavírus ($\chi^2=67,06$; valor- $p=0,000$ e Kappa=0,52).

Estima-se que 21% das infecções por rotavírus sejam do tipo mistas, com mais de uma linhagem de rotavírus presente nas fezes e onde diferentes genótipos podem ser detectados (LINHARES, 2000). Essas infecções também já foram descritas no Brasil e favorecem a ocorrência de rearranjos gênicos e, conseqüentemente, a emergência de cepas com características atípicas (LINHARES, 2000; SANTOS et al., 2003; VOLOTÃO et al., 2006). Nos

dois surtos estudados na cidade de Campinas, infecções mistas aparecem em 4,1% do total de amostras.

A incidência de infecções por rotavírus em países desenvolvidos e em desenvolvimento é muito semelhante. Contudo, a taxa de mortalidade em países em desenvolvimento é maior, devido a quadros de má nutrição, coinfecção por outros parasitas e utilização de água não tratada (PARASHAR, et al., 2003). A maioria das amostras analisadas nesse estudo nos foi encaminhada por Unidades de Saúde da região Sudoeste de Campinas. Essa região é a segunda mais populosa da cidade (23,9% da população total) e possui baixa renda mensal (menos de 5% dos chefes de família possui renda mensal superior a 10 salários mínimos). Além disso, tem o terceiro mais elevado coeficiente médio de desnutrição em crianças com idade inferior a cinco anos (entre 38,6 a 148,7 casos a cada 10.000 habitantes). Esse conjunto de dados caracteriza a região Sudoeste de Campinas como uma região sócio-economicamente menos favorecida, o que poderia explicar o número maior de casos de suspeita de diarreia por rotavírus.

É importante relatar que na região Sudoeste da cidade de Campinas, os genótipos circulantes e a frequência com que os mesmos foram identificados em 2003 e 2004 são bastante diferentes. Analisando os dados obtidos nos dois anos de coleta de amostras, foi possível verificar que o genótipo G1P[8], presente em 38,4% das amostras de 2003, foi identificado somente em 8,4% das amostras de 2004. Enquanto o genótipo G3P[8] mostrou percentuais próximos de identificação nos dois anos de estudo (15,4 e 18,7%, respectivamente), o genótipo G9 aparece em 15,6% das amostras de 2004, contra 7,8% do ano anterior (Tabela 5). Esses dados confirmam achados anteriores de aumento da frequência de G9 em diferentes países, incluindo o Brasil (SANTOS, et al., 2005; PIETRUCHINSKI et al., 2006; VOLOTÃO et al., 2006; CARMONA et al., 2006). Há ainda que se ressaltar, apesar do pequeno número de amostras

analisado em 2003, a diversidade maior de genótipos em circulação no ano de 2004, além da presença de infecções mistas, principalmente na região Sudoeste da cidade (Figura 8). Genótipos não identificados em 2003 aparecem em 2004, como G1P[4], G2P[8], G4P[8], G8P[8] e G6 o que provavelmente se deu pelo maior número de amostras analisadas. No entanto, o aparecimento de amostras P[4] em 2004 nessa região, pode sugerir por futuras substituições de genótipos circulantes e, portanto, maior susceptibilidade a infecções graves por crianças jovens nascidas ou moradoras da região. Estudos filogenéticos para G e P, e sua conseqüente alteração antigênica, que analisem o grau de polimorfismo para esses genes, devem ser efetuados com essas amostras, principalmente se novas vacinas forem introduzidas.

Esses dados confirmam a complexidade da epidemiologia para os rotavírus, bem como a necessidade de estudos longitudinais em todas as regiões do país, para que a vacinação contra os rotavírus tenha a eficácia pretendida, ou seja, reduzir ou até eliminar as taxas de mortalidade e de internações hospitalares associadas à rotavirose.

6 CONCLUSÕES

Tendo como objetivo a identificação e caracterização dos genótipos de rotavírus circulantes na cidade de Campinas, em períodos de surtos de diarreia, nos anos de 2003 e 2004, as principais conclusões são:

1. Nos meses mais secos do ano, tanto em 2003 e 2004, ocorreram surtos de diarreia na cidade de Campinas associados a rotavírus do grupo A;

2. Por *semi-nested* RT-PCR foi possível identificar um número maior de amostras de fezes positivas para rotavírus que pela EGPA ($\chi^2= 67,06$; valor-p:0,000 e Kappa=0,52);
3. Os genótipos G1 a G4 de rotavírus, associados aos genótipos P[4] e P[8] estão entre os de maior prevalência nas amostras analisadas;
4. O genótipo G1P[8] de rotavírus foi identificado em proporção maior no ano de 2004, comparado à frequência de identificação em 2003 ($Z= 30,7$; valor-p: 0,002);
5. O genótipo G9 de rotavírus, considerado como emergente, foi identificado em 13,5% das amostras de fezes analisadas;
6. As características sócio-econômicas das regiões Sul e Sudoeste de Campinas podem ser responsáveis pelo envio de maior número de amostras e, conseqüentemente, pela maior probabilidade de detecção de um número maior de genótipos circulantes nessas regiões.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, M; SCHULZ, S; FISHER, S; NIEMEYER, C M. Detection of rotavirus from stool samples using a standardized immuno-PCR ("Imperacer") method with end-point and real-time detection. **Biochem Biophys Res Commun**, n.333, p.1289-1294, 2005.

BERNSTEIN, D. Live attenuated human rotavirus vaccine, Rotarix. **Semin Pediatr Infect Dis**, n.17, p.188-194, 2006.

BISHOP, R F; DAVIDSON, R F; HOMES, I H; RUCK, B J. Detection of a new virus by electron microscopy of fecal extracts from children with acute gastroenteritis. **Lancet**, n.1, p.149-151, 1974.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doença diarreica por rotavírus**: vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano (VORH). Brasília, 2005.

BRESEE, J S; PARASHAR, U; WIDDOWSON, M A; GENTSCH, J R; STEELE, A D; GLASS, R I. Update on rotavirus vaccines. **Pediatr Infect Dis J**, n.24, p.947-952, 2005.

CARMONA, R C; TIMENETSKY, M C S T; MORILLO, S G; RICHTZENHAIN, L J. Human rotavirus serotype G9, São Paulo, Brazil, 1996-2003. **Emerg Infect Dis**, n.12, p.963-968, 2006.

CASTELLO, A A; ARVAY, M L; GLASS, R I; GENTSCH, J. Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years. **Pediatr Infect Dis J**, n.23 suppl 10, p.168-172, 2004.

CÉSAR, M L V S; EDUARDO, M B P; SILVERA, N Y; MARTINS, B R; SILVA, C C; RODRIGUES, M M; TIMENETSKY, M C S T. Investigação de surto de diarreia: um estudo de coorte retrospectiva em Campinas, São Paulo, Setembro 2004. **Boletim Epidemiológico Paulista**: BEPA, n.15, p.6-11, 2005.

COOK, S M; GLASS, R I; LÊBARON, C W; HO, M S. Global seasonality of rotavirus infections. **Bull Wld Hlth Org**, n.68, p.171-177, 1990.

COULSON, B S; UNICOMB, L E; PITSON, G A; BISHOP, R F. Simple and specific enzyme immunoassay using monoclonal antibodies for serotyping human rotaviruses. **J Clin Microbiol**, n.25, p.509-515, 1987.

CROUCH, C F; WOODE, G N. Serial studies of virus multiplication and intestinal damage in gnotobiotic piglets infected with rotavirus. **J Med Microbiol**, n.11, p.325-334, 1978.

DAS, M; DUNN, S J; WOODE, G N; GREENBER, G H B; RAO, C D. Both surface proteins (VP4 and VP7) of an asymptomatic neonatal rotavirus strain (I321) have high levels of sequence identity with the homologous protein of a serotype 10 bovine virus. **Virology**, n.194, p.374-379, 1993.

ESTES, M K. Advances in molecular biology: impact on rotavirus vaccine development. **J Infect Dis**, n.174, p.37-46, 1996.

ESTES, M K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D M; HOWLEY, P M; GRIFFIN, D E; et al. (eds.). **Fields Virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p.1747-1785.

ESTES, M K; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiol Rev**, n.53, p.410-449, 1989.

FLEWETT, T H; BRYDE, A S; DAVIES, H; WOOD G N; BRIDGER J C; DERRICK, J M. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. **Lancet**, n.2, p.61-63, 1974.

FLORES, J; BOEGGEMAN, E; PURCELL, R H; SERENO, M; PEREZ, I; WHITE, L; WYATT, R V; CHANOCK, R M; KAPIKIAN, A Z. A dot hybridisation assay for detection of rotavirus. **Lancet**, n.1, p.555-558, 1983.

GENTSCH, J R; GLASS, I R; WOODS, P; GOUVEA, V; GORZIGLI, M; FLORES, J; DAS, B K; BHAN, M K. Identification group A gene 4 types by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, n.30, p.1365-1373, 1992.

GLASS, R I. Combate ao Rotavírus. **Sci Am Brasil**, n.48, p.1-10, 2006.

GLASS, R I; BRESEE, J S; PARASHAR, U; TURCIUS, R; FISHER, T; JIANG, B; WIDDOWSON, M A; GENTSCH, J R. Rotavirus vaccines: past, present and future. **Arch Pédiatr**, n.12, p.844-847, 2005.

GLASS, R I; PARASHAR, U D; BRESEE, J S; TURCIOS, R; FICHER, T K; WIDDOWSON, M A; JIANG, B; GENTSCH, J R. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. **Lancet**, n.368, p.323-368, 2006.

GOMEZ, G G. The colostrum-deprived, artificially-reared, neonatal pig as a model animal for studying rotavirus gastroenteritis. **Front Biosci**, n. 2, p. 471-481, 1997.

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

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

GRAHAN, D Y; DUFOUR, G R; ESTES, M K. Minimal infective dose of rotavirus. **Arch Virol**, n.92, p.261-271, 1987.

GRIFFIN, D D; NAKAGOMI, T; HOSHINO, Y; NAKAGOMI, O; KIRKWOOD, C D; PARASHAR, U D; GLASS, R I; GENTSCH, J R. Characterization of non typicable rotavirus strain from the United States: identification of new rotavirus reassortment (P2A[6], G12) and rare P3[9] strains related to bovine rotaviruses. **Virology**, n.294, p.256-269, 2002.

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

HOLMES, I H; RUCK, B J; BISHOP, R F; DAVIDSON, G P. Infantile enteritis viruses: morphogenesis and morphology. **J Virol**, n. 16, p. 937-943, 1975.

HOSHINO, Y; KAPIKIAN, A Z. Rotavirus antigens. **Curr Top Microbiol Immunol**, n.185, p.179-227, 1994.

ISA, P; ARIAS, C F; LÓPEZ, S. Role of sialic acids in rotavirus infections. **Glycoconj J**, n.23, p. 27-37, 2006.

ITURRIZA-GÓMARA, M; KANG, G; GRAY, J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotavirus. **J Clin Microbiol**, n.31, p.259-265, 2004.

JIANG, B; GENTSCH, J R; GLASS, R I. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. **Clin Infect Dis**, n.34, p.1351-1361, 2002.

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

KANG, G; KELKAR, S D; CHITAMBAR, S D; PRATIMA, R; NAIK, T. Epidemiological profile of rotaviral infection in India: challenges for the 21st century. **J Infect Dis**, n.192, p.120-126, 2005.

KAPIKIAN, A Z; CHANOCK, R M. Rotaviruses. In: FIELDS, B N; KNIPE, D M; HOWLEY, P M, et al.(eds). **Fields Virology**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1996, p.1657-1708.

KAPIKIAN, A Z; SIMONSEN, L; VESIKARI, T; HOSHINO, Y; MORENS, D M; CHANOCK, R M; LA MONTAGNE, R J; MURPHY, B R. A hexavalent human rotavirus–bovine Rotavirus (UK) reassortant vaccine designed for use in developing countries and delivered in a schedule with the potential to eliminate the risk of intussusception. **J Infect Dis**, n.192, suppl. 1, p.22-29, 2005.

KAPIKIAN, A Z; WYATT, R G; DOLIN, R D; THORNHILL, T S; KALICA, A R; CHANOK, R M. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **J Virol**, n.5, p.1075-81, 1972.

LINHARES, A C. Rotavirus infection in Brazil: epidemiology and challenges for control. **Cad Saúde Publica**, n.16, p.629-646, 2000.

LÓPEZ, T; LÓPEZ, S; ARIAS, C F. Heat shock enhances the susceptibility of BHK cells to rotavirus infection through the facilitation of entry and post-entry virus replication steps. **Virus Res**, n.121, p.73-84, 2006.

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

MONTENEGRO, F M U; CORREIA, J B; FALBO, A R; DOVE, W; NAKAGOMI, T; NAKAGOMI, O; CUEVAS, L E; CUNLIFFE, N A; HART, C A. Anticipating rotavirus vaccines in Brazil. **J Med Virol**, n.79, p.335-340, 2007.

OLIVEIRA, C S; LINHARES, A C. Rotavirus: clinical features and prevention. **J Pediatr (Rio J)**, n.75, suppl. 1, p.91-102, 1999.

PARASHAR, U D; HUMMELMAN, E G; BRESEE, J S; MILLER, M A; GLASS, R I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerg Infect Dis**, n.5, p.565-572, 2003.

PARASHAR, U D; ALEXANDER, J P; GLASS, R I. Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR**, n.55, p.1-13, 2006.

PEREIRA, H G; LINHARES, A C; GLASS, R I. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. **Bulletin PAHO**, n.27, p.224-233, 1993.

PÉREZ-VARGAS, J; ISA, P; LÓPEZ, S; ARIAS, C F. Rotavirus vaccine: early introduction in Latin America-risks and benefits. **Arch Med Res**, n.37, p.01-10, 2006.

PESQUISA FAPESP: Ciência e Tecnologia no Brasil. São Paulo: Fapesp, n.120, p.61, fev 2006.

PIETRUCHINSKI, E; BENATI, F; LAURETTI, F; KISIELIUS J; UEDA, M; VOLOTAO, E M; SOARES, C C; HOSHINO, Y; LINHARES, R E; NOZAWA, C; SANTOS N. Rotavirus diarrhea in children and adults in a southern city of Brazil in 2003: distribution of G/P types and finding of a rare G12 strain. **J Med Virol**, n.78, p.1241-1249, 2006.

RAMIG, R F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **J Virol**, n.78, p.10213-10220, 2004.

RUIZ-PALACIOS, G M; PÉREZ-SCHAEL, I; VELÁZQUEZ, F R; ABATE, H; BREUER, T; CLEMENS, S C; CHEUVART, B; ESPINOZA, F; GILLARD, P; INNIS, B L; CERVANTES, Y; LINHARES, A C; LOPEZ, P; MACÍAS-PARRA, M; ORTEGA-BARRÍA, E; RICHARDSON, V; RIVERA-MEDINA, D M; RIVERA, L; SALINAS, B; PAVÍA-RUZ, N; SALMERÓN, J; RÜTTIMANN, R; TINOCO, J C; RUBIO, P; NUÑEZ, E; GUERRERO, M L; YARZÁBAL, J P; DAMASO, S; TORNIEPORTH, N; SÁEZ-LLORENS, X; VERGARA, R F; VESIKARI, T; BOUCKENOOGHE, A; CLEMENS, R; DE VOS, B; O'RYAN, M. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. **N Engl J Med**, n.354, p.11-22, 2006.

SAIF, L J; JIANG, B. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. **Curr Top Microbiol Immunol**, n.185, p.339-371, 1994.

SALINAS, B; SCHAEEL, I P; LINHARES, A C; RUIZ PALACIOS, G M; GUERRERO, M L; YARZABAL, J P; CERVANTES, Y; CLEMENS, S C; DAMASO, S; HARDT, K; DE VOS, B. Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy of an attenuated rotavirus vaccine, RIX4414: A randomized, placebo-controlled trial in Latin American infants. **Pediatr Infect Dis J**, n.24, p.807-816, 2005.

SAMMONS, D N; ADDANS, L D; MISHIKAWA, E E. Ultrasensitive silver base color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, n.2, p.135-141, 1981.

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

SANTOS, N; SOARES, C C; VOLOTÃO E M; ALBUQUERQUE, M C M; HOSHINO, Y. Surveillance of rotavirus strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999. **J Clin Microbiol**, n.41, p.3399-3402, 2003.

SANTOS, N; VOLOTAO, E; SOARES, C C; CAMPOS, G S; SARDI, S I; HOSHINO, Y. Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies. **J Clin Microbiol**, n.43, p.4064-4069, 2005.

TARAPOREWALA, Z F; PATTON, J T. Non structural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. **Virus Res**, n.101, p.57-66, 2004.

TIMENETSKY, M C S T; SANTOS, N; GOUVEA, V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. **J Clin Microbiol**, n.32, p.2622-26224, 1994.

THEIL, K W; BOHL, E H; CROSS, R F; KOHLER, E M; AGNES, A G. Pathogenesis of porcine rotaviral infection in experimentally inoculated gnotobiotic pigs. **Am J Vet Res**, n.39, p.213-220, 1978.

VARGHESE, V; DAS, S; SINGH, N B; KOJIMA, K; BHATTACHARYA, S K; KRISHNAN, T; KOBAYASHI, N; NAIK, T N. Molecular characterization of a human rotavirus reveals porcine characteristics in most of the genes including VP6 and NSP4. **Arch Virol**, n.149, p.155-172, 2004.

VESIKARI, T; KARVONEN A; PUUSTINEN, L; ZENG, S Q; SKAZAL E D; DELEM, A; DEVOS, B. Efficacy of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in Finnish infants. **Pediatr Infect Dis J**, n.23, p.937-943, 2004.

VOLOTÃO, E M; SOARES, C C; MARANHÃO, A G; ROCHA, L N; HOSHINO, Y; SANTOS, N. Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro-Brazil during 2000-2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities. **J Med Virol**, n.78, p.263-72, 2006.

WILHELMI, I; ROMAN, E; SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Viruses causing gastroenteritis. **Clin Microbiol Infect**, n.9, p.247-262, 2003.

XU, L; HARBOUR, D; McCRAE, M. The application of polymerase chain reaction to the detection of rotaviruses in faeces. **J Virol Methods**, n.27, p.29-37, 1990.

CEPAGRI: <http://orion.cpa.unicamp.br>.

COVISA: www.campinas.sp.gov.br/saude

ICV: <http://tabnet.saude.campinas.sp.gov.com>.



CEP, 24/01/06
(PARECER PROJETO 483/2004)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ANÁLISE MOLECULAR DE PICOBIRNAVÍRUS (PBV) EM AMOSTRAS FECAIS DE HUMANOS DE DOIS GRUPOS DE INDIVÍDUOS: IMUNOLOGICAMENTE DEPRIMIDOS E IMUNOLOGICAMENTE COMPETENTES"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Izabel Julien Martini

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a emenda que altera o título para "IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES E GENOTIPOS DE ROTAVÍRUS EM AMOSTRA DE FEZES DE HUMANOS OBTIDAS EM CAMPINAS-SP", poderá ou não incluir amostras com diarreia provenientes de crianças e ou/adultos imunossuprimidos ou não; as amostras de fezes coletadas serão processadas também para pesquisa de rotavírus e as amostras a serem analisadas serão provenientes do HC/UNICAMP, bem como de Postos de Saúde de Campinas, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.


Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

