



Alessandra Abel Borges

**Detecção do rotavírus do grupo C e análise da
variabilidade genética em amostras de fezes de
crianças de Belém do Pará, através de RT-PCR e
PCR-RFLP**

**Florianópolis
2001**

Alessandra Abel Borges

**Detecção do rotavírus do grupo C
e análise da variabilidade genética
em amostras de fezes
de crianças de Belém do Pará,
através de RT-PCR e PCR-RFLP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina visando à
Obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Célia Regina Monte Barardi

Florianópolis
2001

BORGES, Alessandra Abel.

Detecção da presença e da variabilidade do rotavírus do grupo C em amostras de fezes de crianças de Belém do Pará, através de PCR e PCR-RFLP/Alessandra Abel Borges. Florianópolis, 2001. 137p.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

1. rotavírus do grupo C. 2. RT-PCR. 3. PCR-RFLP. 4. epidemiologia

“DETECÇÃO DO ROTAVÍRUS DO GRUPO C E ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM AMOSTRAS DE FEZES DE CRIANÇAS DE BELÉM DO PARÁ, ATRAVÉS DE RT-PCR E PCR-RFLP”

POR

ALESSANDRA ABEL BORGES

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:


Célia Regina Monte Barardi

(MIP/CCB/UFSC – Membro Titular)


Carlos Frederico Tourinho dos Santos

(CCBS/UNISUL -Membro Titular)


Carlos Roberto Zanetti

(MIP/CCB/UFSC – Membro Titular)



**Profª.Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC**

Florianópolis, 23 de Fevereiro de 2001.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Aplicada, coordenado pelas professoras Dr^a Célia Regina Monte Barardi (Depto. de Microbiologia e Parasitologia, CCB) e Dr^a Cláudia Maria Oliveira Simões (Depto. de Ciências Farmacêuticas, CCS), na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.

Recebeu apoio do Programa de Pós Graduação em Farmácia, e também a concessão de Bolsa de Mestrado (CAPES).

*"Eu sustento que a única finalidade da ciência
está em aliviar a existência da miséria
humana."*

BERTOLT BRECHT

Dedico este trabalho aos meus pais queridos, Valdir e Odila, pela educação e por todo apoio que sempre me deram, por seus valores reais, por seus exemplos, pela luta honesta, pelo incentivo, por suas saudades e abdições, por seu amor. A minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

A equipe de Virologia do Instituto Evandro Chagas (Belém/PA), especialmente ao Dr. Alexandre Linhares e a Yvone Gabbay, pelo fornecimento das amostras, dos dados imunológicos, das informações clínicas dos pacientes e das discussões prévias do trabalho.

A Prof^a Célia Regina Monte Barardi, por seus ensinamentos, sua atenção e orientação, e pela sua amizade.

A Prof^a Cláudia Maria Oliveira Simões, pelas opiniões críticas, sensatas e construtivas.

Ao Prof Celso Spada, por todos os seus conselhos, desde o início, pela ajuda em diversos momentos, por sua amizade e enigmas recheados de sabedoria.

A Prof^a Miriam Barcellos Falkenberg, pelas palavras de incentivo, por seus conselhos e sua ajuda, por sua exaustiva dedicação à Coordenação, por ter lutado por minha Bolsa estudos.

A Prof^a Jane Maria de Souza Philippi, Depto. de Saúde Pública, CCS, por suas opiniões e conselhos em meus resultados, tão importantes em meu trabalho, e por sua disposição em atender-me.

Ao Prof Manoel Rosa de Oliveira Lino, Depto. de Informática e Estatística, CTC, pelas Análises Estatísticas deste trabalho, pelo tempo que dedicou-me mesmo em suas férias.

Ao Prof Maurício Sedrez dos Reis, Depto. de Fitotecnia, CCA, por sua disposição em ler meu projeto e atender-me prontamente; por sua contribuição e dicas extremamente relevantes a este trabalho.

Aos Profs Mário Steindel e Edmundo Grisard, por suas dicas valiosas.

A Prof^a Fátima M. Barreto Silva e ao Cleidson, cujas abdições tornaram possível eu realizar este projeto. Ao Cleidson, ainda, o meu agradecimento por sua amizade e gestos solidários.

Aos grandes e valiosos amigos, Ione, Silvio e Wanessa, por seus imensos corações, por toda ajuda que me deram, pela amizade sincera e por seus exemplos gratuitos de solidariedade humana.

A Giana, pela amizade, pelas filosofias, pelos bons momentos na alegria e pela força nos dias difíceis.

As meninas do Laboratório, por sua ajuda seja em conversas, seja em atos, Adriane, Carol, Cecília, Thaís, e em especial a Juli, grande amiga, que ajudou-me muito nos momentos finais.

A Christiane, amiga e companheira do laboratório, com sua imensa simplicidade e conhecimento, por toda ajuda que me deu durante a realização das práticas e também fora delas.

A minha velha amiga, Maria Laura, por seu apoio no início, e por seus exemplos de coragem e atitude.

Ao Carlos Alberto, por seu amor, seu apoio, sua ajuda e seus cuidados comigo. Pelo calor do seu coração e pelos momentos de felicidade pura que vivemos.

Aos pacientes, cujos rostos desconheço, que já devem ser adultos, e que forneceram um rico material de estudo.

A minha gratidão a todos aqueles que ajudaram a tornar realidade um antigo sonho!

Alessandra

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	XI
RESUMO	XII
SUMMARY	XIV
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. GASTROENTERITES	2
1.2. OS ROTAVÍRUS	3
1.2.1. <i>Microbiologia dos rotavírus</i>	4
1.2.2. <i>Patogênese</i>	8
1.2.3. <i>Transmissão</i>	9
1.2.4. <i>Doença e complicações</i>	11
1.2.5. <i>Terapia</i>	12
1.2.6. <i>Prevenção</i>	13
1.3. A EPIDEMIOLOGIA	15
1.3.1. <i>Epidemiologia do Rotavírus</i>	18
1.3.2. <i>Epidemiologia do Rotavírus do Grupo C</i>	19
1.5. TÉCNICAS MOLECULARES	25
1.5.1. <i>RT-PCR</i>	25
1.5.1.1. <i>Cuidados na realização do PCR</i>	25
1.5.2. <i>Subtipagem molecular baseada na sequência de nucleotídeos</i>	27
1.5.2.1. <i>Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP)</i>	28
1.5.2.2. <i>RFLP de produtos amplificados por PCR (PCR-RFLP)</i>	29
2. RELEVÂNCIA DO PRESENTE TRABALHO	32
3. OBJETIVOS	34
3.1. OBJETIVO GERAL	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. ÁREA DE ESTUDO	36
4.2. PACIENTES E AMOSTRAS	37
4.3. ENSAIO IMUNO-ENZIMÁTICO TIPO SANDUÍCHE PARA DETECTAR ANTÍGENO DE GRUPO (VP6) DOS ROTAVÍRUS DO GRUPO C	40
4.4. PRODUÇÃO DE FLUÍDO INFECCIOSO DO ROTAVÍRUS GRUPO C (RVC) (ESTOQUE VIRAL)	41
4.5. PREPARO DAS SUSPENSÕES DE FEZES	42
4.6. ISOLAMENTO DO RNA VIRAL A PARTIR DAS SUSPENSÕES DE FEZES	42
4.6.1. <i>Extração com fenol-clorofórmio</i>	42
4.6.2. <i>Extração com Trizol™</i>	43
4.7. ENSAIOS DE RT-PCR E NESTED PCR	43
4.7.1. <i>Transcrição-reversa (RT) das amostras de RNA viral</i>	44
4.7.2. <i>Primeira reação de PCR</i>	45
4.7.3. <i>Reação de nested PCR</i>	46
4.7.4. <i>Análise dos produtos de PCR por eletroforese em géis de agarose ou de poliacrilamida</i>	46
4.8. TRATAMENTO DOS PRODUTOS DO NESTED PCR COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO PARA ANÁLISE DE PCR-RFLP	46
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	48

4.10 CÁLCULO DO COEFICIENTE DE ATAQUE	49
5. RESULTADOS.....	51
5.1 DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS DO GRUPO C EM AMOSTRAS DE FEZES PELO MÉTODO DO RT-PCR.....	51
5.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE ELISA DE CAPTURA DE ANTÍGENO VP6 DA LINHAGEM COWDEN E RT-PCR PARA DETECÇÃO DO GENE 5 DO ROTAVÍRUS DO GRUPO C EM AMOSTRAS DE FEZES.....	63
5.3 CORRELAÇÃO ENTRE SINTOMAS CLÍNICOS E A PRESENÇA DO ROTAVÍRUS DO GRUPO C DETECTADO POR RT-PCR (GENE 5).....	64
5.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE EXCREÇÃO DO ROTAVÍRUS DO GRUPO C E O COMPORTAMENTO DO HOSPEDEIRO EM 76 AMOSTRAS DE FEZES DE UM MESMO PACIENTE.....	67
5.5 ANÁLISES DE RFLP.....	70
6. DISCUSSÃO	78
6.1 ENSAIOS ENVOLVENDO A TÉCNICA DE RT-PCR	79
6.2 ANÁLISES DE PATOGENICIDADE, INCIDÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL E SAZONALIDADE DOS RVC, NA REGIÃO DE BELÉM DO PARÁ	82
6.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS METODOLOGIAS DE ELISA E RT-PCR PARA DETECÇÃO DO RVC	87
6.4 ANÁLISE DOS SINTOMAS CLÍNICOS ASSOCIADOS AO RVC, E DO PERFIL DE EXCREÇÃO DOS MESMOS EM UMA CRIANÇA ACOMPANHADA QUINZENALMENTE	91
6.5 ANÁLISES ENVOLVENDO ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (PCR-RFLP)	95
7. CONCLUSÕES	101
8. PERSPECTIVAS DO TRABALHO	103
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B.M.: banho-maria

°C: graus celsius

CDC: Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA

cDNA: DNA complementar

cfu: unidades formadoras de colônias

dNTPs: desoxirribonucleotídeos trifosfatos

dATP: 2'- deoxiadenosina 5'-trifosfato

dCTP: 2'-deoxicitidina 5'-trifosfato

dGTP: 2'- deoxiguanosina 5'-trifosfato

dTTP: 2'- deoxitimidina 5'-trifosfato

DTT: ditioneitol

ECP: efeito citopático

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay (enzimoimunoensaio)

EUA: Estados Unidos da América

g: grama

ID.: identificação

IEC: Instituto Evandro Chagas

LVA: Laboratório de Virologia Aplicada, MIP, CCB, UFSC

ME: microscopia eletrônica

MEM: Meio Mínimo Essencial

µg: microgramas

µl: microlitros

mL: mililitros

MilliQ: sistema de ultra purificação de água

M-MLV: Moloney Murine Leukemia Virus

min.: minutos

nm: nanômetros

NSP(n): non-structural proteins (proteínas não estruturais)

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

pb: pares de base

PBS: tampão salina fosfato

Pcte: paciente

RRV: rhesus rotavirus quadrivalent vaccine (vacina quadrivalente de rotavírus)

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição)

rpm: rotações por minuto

RT: reverse transcription (transcrição reversa)

RT-PCR: Reverse transcription- Polymerase Chain Reaction (Transcrição reversa- Reação em Cadeia da Polimerase)

RVA: Rotavírus do grupo A

RVC: Rotavírus do grupo C

SDS: dodecil sulfato de sódio

S11: segmento genômico 11

S10: segmento genômico 10

s: segundos

SFB: soro fetal bovino

Taq : *Thermus aquaticus*

T.A.: temperatura ambiente

TCID₅₀: Tissue Culture infective dose (Dose infecciosa que destrói 50% das células)

UK: United Kingdom (Reino Unido)

VP(n): virus protein (proteína viral)

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 A e B	4
Figura 2	5
Figura 3	18
Figura 4	36
Figura 5	39
Figura 6	53
Figura 7	54
Figura 8	55
Figura 9	56
Figura 10 A e B	57
Figura 11	59
Figura 12	61
Figura 13	61
Figura 14	62
Figura 15	62
Figura 16	63
Figura 17	67
Figura 18 A e B	72
Figura 19 A e B	73
Figura 20 A e B	74
Figura 21 A e B	75
Figura 22 A e B	76
Tabela 1	8
Tabela 2	38
Tabela 3	44
Tabela 4	45
Tabela 5	46
Tabela 6	48
Tabela 7	58
Tabela 8	65
Tabela 9	66

RESUMO

Os rotavírus são os agentes etiológicos virais mais comuns causando diarreia severa em humanos e animais. Dentre os sete diferentes grupos de rotavírus até então descritos, somente os sorogrupos A,B e C causam gastroenterites em seres humanos. A carência de testes específicos para a detecção de rotavírus pertencentes aos grupos B e C contribui para a alta proporção de casos de diarreia de etiologia desconhecida. É extremamente difícil de detectar os rotavírus do grupo C (RVC) através de procedimentos de rotina. A transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) é o método mais sensível para a detecção do rotavírus do grupo C e é considerado o "padrão ouro" de diagnóstico. A técnica de PCR-RFLP pode ser utilizada para detectar variabilidades genéticas num mesmo sorogrupo de rotavírus evidenciando desta forma diferentes genótipos virais. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o período patogênico das infecções causadas pelo rotavírus do grupo C em uma comunidade de crianças de uma região de Belém do Pará utilizando as técnicas de RT-PCR (gene 5 do RVC) e PCR-RFLP no período de março de 1983 a março de 1986. Das 153 amostras analisadas (83 de 30 crianças e 70 de uma mesma criança), 95 (62,1%) foram positivas e 58 (37,9%) foram negativas para o gene 5 do RVC detectados por RT-PCR. Das 95 amostras positivas, 18 (19%) eram diarreicas e 77 (81%) eram assintomáticas. Das 58 amostras negativas, 14 (24%) eram diarreicas e 44 (76%) eram assintomáticas. A análise estatística, feita pelo teste do Qui-quadrado, mostrou que não há diferença significativa entre as amostras diarreicas positivas e negativas, ao nível de $\alpha=0,05$ sendo que o valor obtido de $X^2 = 0,587$. Os perfis de restrição encontrados para a linhagem Cowden (controle positivo) com as enzimas Mbol, Xbal e Alul foram os mesmos encontrados em 14 amostras analisadas clínicas de pacientes distintos e 21 amostras de mesmo paciente. Foram encontrados diferentes perfis de restrição em 3 amostras que podem sugerir variabilidade genética da espécie de RV envolvida ou de um vírus sorológica e/ou geneticamente semelhante ao RV. O presente trabalho confirmou que as técnicas de RT-PCR e de RFLP são úteis e eficazes para a detecção e caracterização de rotavírus do grupo C em amostras de fezes. Devido a alta sensibilidade do método de amplificação gênica, extremo cuidado deve ser tomado para evitar contaminações cruzadas e com isso gerar resultados seguros e confiáveis.

SUMMARY

Rotaviruses are agent of gastroenteritis and are the major viral etiologic agent of severe diarrheal disease in children and in the young of other mammalian and avian species. Rotaviruses are classified into seven serogroups (A-G), but only three (A,B and C) have been associated with diarrhea in humans. The incidence and disease burden of rotaviruses form groups B and C in humans remain unclear because sensitive diagnostic assays are not available. Group C rotaviruses remain extremely difficult to detect by using routine procedures. The reverse transcription followed by genetic amplification (RT-PCR) was established as the most sensitive method ("golden standard") for RVC detection and , in addition, ELISA technique can be helpful for confirmation of the results. The characterization of viral sequences (previously amplified by PCR) by analysis of the restriction fragment length polymorphism (RFLP) is very useful to detect the strain diversity in clinical samples. Our objective was to investigate the pathogenic period of the infections caused by RVC in one children community in Belem, Para State, using RT-PCR with primers from the conserved region of the gene 5, and analysis of the second amplification products (nested primers) with 4 restriction enzymes: Alul, Mbol, BglI and XbaI. From 153 faecal samples analysed (83 from 30 children and 70 from the same child), 95 (62,1%) were positive and 58 (37,9%) were negative in RT-PCR. From the 95 positive samples, 18 (19%) presented diarrhea and 77 (81%) were asymptomatic. The statistical analysis performed with X^2 had shown no difference between the diarrheic positive and negative sample ($\alpha=0,05$ and $X^2=0,587$). We compared 17 amplicons profiles derived from different children and 21 amplicons derived from the same child with the positive control porcine strain (Cowden). The profiles found in selected human stools and the porcine one showed a similarity to RFLP profiles except for 3 samples which presented different profiles. This diversity is attributable to the presence of different rotavirus strains and/or to point mutations in the restriction sites. The present work confirmed that the RT-PCR and the PCR-RFLP seem to be powerful methods to detect and evaluate the presence and diversity of RVC in clinical samples. In addition the combination of RT-PCR and RFLP methods provides new comparative data on the presence of RVC in clinical samples and offers an interesting approach for molecular epidemiological studies.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gastroenterites

O intestino humano é um vasto reservatório de microorganismos, a maioria deles de origem bacteriana (aproximadamente 10^{12} cfu/g de fezes). No entanto, uma variedade de vírus pode também ser encontrada no trato gastrointestinal e nas fezes. Esses vírus podem infectar as próprias bactérias (bacteriófagos), podem utilizar o intestino como porta de entrada para causar infecções em outros tecidos, ou ainda, causar infecções gastrointestinais. Neste último grupo, estão aqueles que causam danos ao trato gastrointestinal, provocando vômitos, diarreias ou ambos, e engloba: Rotavírus, Astrovírus, Calicivírus, Adenovírus 40/41, Calici-like vírus e vírus Norwalk (HART e CUNLIFFE, 1999).

A doença diarreica é a quarta maior causa de mortes no mundo, resultando num número estimado de 3 milhões de óbitos/ano (MURRAY e LOPEZ, 1997). A maioria delas ocorre em crianças menores de 5 anos de idade em países em desenvolvimento (BERN et al., 1992) e a maioria dos casos de doença diarreica em crianças é causada por viroses (DESSELBERGER, 1998). Nos Estados Unidos, a gastroenterite é a segunda maior causa de infecções (sendo a primeira as infecções respiratórias virais). O Center for Disease Control and Prevention (CDC) estima que, em crianças menores de 5 anos, aproximadamente 35 milhões de episódios de diarreia ocorrem anualmente, resultando em mais do que 200.000 hospitalizações e cerca de 500 mortes (DENNEHY, 2000).

Em países em desenvolvimento, a diarreia aguda é a maior causa de morte e é um determinante da má-nutrição em crianças abaixo de 5 anos de idade (McAULIFFE et al., 1986; PUFFER e SERRANO, 1973; RHODE e NORTHRUP, 1976; ROWLAND et al., 1977; STEWIEN et al., 1991). As crianças que apresentam infecções intestinais repetidas, freqüentemente não atingem o crescimento e o desenvolvimento normal ou apresentam desnutrição crônica, uma condição que eventualmente termina em morte (PUFFER E SERRANO, 1973; YUNES, 1981). No Brasil, a mortalidade infantil é alta na região nordeste, onde mais de 14% das crianças morrem durante os primeiros 5 anos de vida e mais de 50% dessas mortes têm a diarreia como principal causa, ou associada, da morte (STEWIEN et al., 1991)

A importância relativa de cada enteropatógeno depende de uma variedade de fatores, incluindo aqueles referentes a sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos, a idade do grupo estudado, a duração do estudo, bem como, a estação do ano em que ele é

realizado, a localização geográfica e se o estudo foi feito na comunidade ou na área hospitalar (HART e CUNLIFFE, 1999). Os rotavírus causam cerca de 50% das diarreias relatadas nas admissões hospitalares e em 20 a 25% dos pacientes pediátricos atendidos em clínicas, resultando em um significativo número de visitas médicas, hospitalizações e mortes (BRANDT et al, 1983; KOOPMAN et al., 1984; MATSON e ESTES, 1990; GLASS et al., 1996).

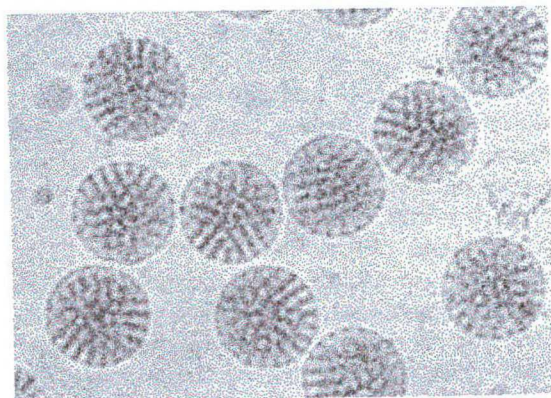
1.2. Os rotavírus

Em todo o mundo, os rotavírus são os agentes etiológicos virais mais comuns causando diarreia em humanos e animais (SAIF et al,1980; TSUNEMITSU et al, 1991; SAIF e JIANG, 1994a). Os rotavírus foram pela primeira vez identificados por microscopia eletrônica (ME) em camundongos em 1963 (ADAMS e KAFT, 1963). Dez anos depois, os rotavírus foram pela primeira vez identificados em humanos, quando vírus de morfologia similar àquela foram encontrados em biópsia intestinal de crianças com gastroenterite aguda não bacteriana (BISHOP et al., 1973). Desde então, numerosos estudos epidemiológicos têm documentado a alta prevalência dos rotavírus nos casos de diarreia severa entre crianças. A incidência destes vírus é a mesma em países desenvolvidos e em desenvolvimento, mas o impacto é significativamente maior nos países em desenvolvimento (HART e CUNLIFFE, 1999), causando um número estimado de aproximadamente 870.000 mortes por ano de crianças de 1-4 anos de idade (INSTITUTE OF MEDICINE, 1986). Em vista disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem lançado programas globais que incluem o uso de sais de rehidratação oral, os quais têm contribuído grandemente para o decréscimo das taxas de mortalidade, embora as taxas de morbidade não tenham diminuído (BERN et al, 1992). Devido ao impacto que as infecções por rotavírus causam na economia e na saúde de humanos e animais (incluindo macacos, gatos, cães, gado bovino, porcos, ovelhas e galinhas) (HART e CUNLIFFE,1999), estes vírus têm sido extensamente estudados no mundo todo (STEELE, 1999).

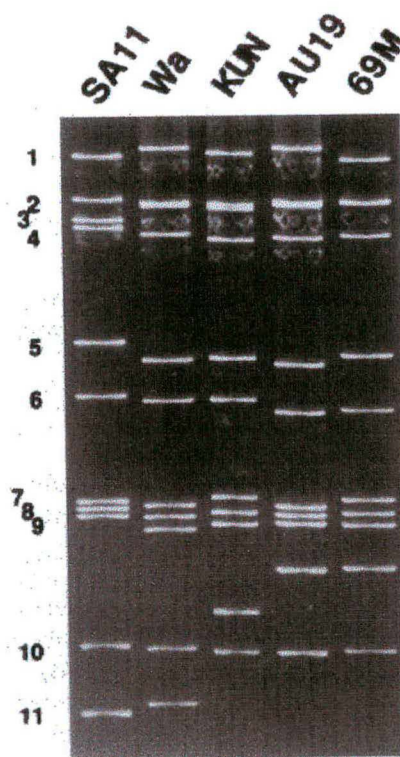
1.2.1. Microbiologia dos rotavírus

Os rotavírus pertencem a um dos nove gêneros da família *Reoviridae* (MATHEWS, 1979). São vírus não envelopados de 70 a 75 nm de diâmetro, de simetria icosaédrica, com morfologia de duplo capsídeo e com aspecto semelhante a uma roda, o que explica a origem do seu nome (FLEWETT et al., 1974) (Fig. 1 A). Devido a ausência do envelope lipídico, estes vírus são relativamente estáveis ao calor, à solventes lipídicos e à valores extremos de pH (STEELE, 1999).

Possuem um genoma de 11 segmentos de RNA dupla fita (dRNA), com polaridade positiva (sua replicação ocorre via RNA polimerase RNA-dependente). Os 11 segmentos do RNA viral podem ser separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (FIG. 1 B) (TANIGUCHI et al, 1986). O perfil dos segmentos genômicos é identificado em PAGE, e a análise de tais perfis (eletroferotipagem) é largamente utilizada para caracterizar diferentes cepas de rotavírus.



A



B

Fig 1: Microscopia eletrônica (A) e perfil eletroforético dos 11 segmentos (B) do rotavírus (de cinco cepas diferentes). Adaptado de Yeager, M. et al. (1994) (A) e Nakagomi et al. (1999) (B).

Variações na mobilidade individual dos segmentos têm sido encontradas tanto entre rotavírus de um mesmo grupo quanto de grupos diferentes. Três perfis diferentes (longo, curto e super-curto) são associados com diferenças na mobilidade do segmento 11 (S11) para linhagens de padrão longo, e do segmento 10 (S10) para aquelas de padrão curto e super-curto. A diversidade eletroforética é supostamente derivada da diversidade do genoma viral que, à semelhança do que ocorre com o vírus da influenza, pode envolver, três diferentes mecanismos: mutações pontuais, rearranjos gênicos e reorganização. Até mesmo uma única substituição de base pode alterar a mobilidade dos segmentos e, provavelmente, causar modificações na estrutura secundária (TANIGUCHI e URASAWA, 1995). A mutação é geralmente considerada a fonte primária de diversidade genética. Como para os outros vírus de genoma RNA, tem-se suposto que os rotavírus apresentam altas taxas de mutação porque a sua replicação viral é um processo propenso a erros (RAMIG, 1997). O fenômeno de rearranjos gênicos pode ocorrer quando células são infectadas com duas linhagens diferentes, mas compatíveis de rotavírus. Assim, uma alta porcentagem da progênie pode conter novas variantes de segmentos gênicos. O termo reorganização gênica significa, usualmente, alterações consideráveis em regiões da seqüência dentro de um mesmo segmento genômico, algumas vezes em forma de deleções e, freqüentemente, como duplicações. Este termo não indica recombinação entre frações de diferentes segmentos; embora isso ainda seja possível, não há documentação a este respeito (TANIGUCHI e URASAWA, 1995).

Cada segmento do genoma codifica uma proteína viral. São seis proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, e VP7) e cinco proteínas não-estruturais (NSP1 até NSP5). As proteínas VP 1, VP2 e VP3 formam o núcleo do vírus e estão envolvidas na replicação do RNA. A VP6 é a proteína majoritária do capsídeo interno, a VP7 é a proteína glicosilada majoritária do capsídeo externo e a VP4 é uma proteína externa aparecendo na forma de 60 espículas que atravessam o capsídeo externo (PRASAD e CHIU, 1994) (Fig.2)

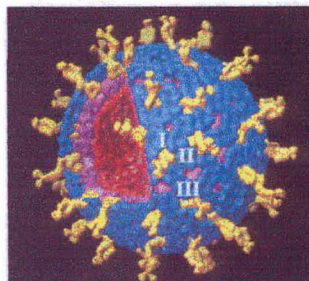


Fig. 2: Estrutura tridimensional do rotavírus. Adaptado de Yeager et al. (1994).

Legenda:

Em amarelo, proteína mais externa, VP4
 Em azul, capsídeo externo de glicoproteína, VP7
 Em roxo, capsídeo interno, VP6
 Em vermelho, core viral, VP2

A proteína VP6 é sorogrupos específica, ou seja, confere antigenicidade aos rotavírus (PEDLEY et al., 1983), dividindo-os em 7 sorogrupos distintos (grupos A, B, C, D, E, F, G) embora sejam morfológicamente indistinguíveis por microscopia eletrônica. Os rotavírus do grupo A são ainda classificados de acordo com suas especificidades antigênicas, em subgrupo (1), sorotipo G (2) e sorotipo P (3), a saber:

(1) A proteína VP6 pode ainda subdivir o grupo A em sub-grupos: I, II, não-I-não II e I+II. Relata-se que a proteína VP2 também pode conferir especificidade de sub-grupo (TANIGUCHI et al, 1986);

(2) Os sorotipos G (G de glicoproteína [ESTES, 1996a]) são associados à proteína VP7, e 14 sorotipos diferentes já foram relatados;

(3) O sorotipo P (P de *protease-sensitive*, variando de P1 a P20 [ESTES, 1996a]) é definido pela proteína VP4, contudo, como existem dificuldades em diferenciar sorotipos P sorologicamente, o termo "genotipo P", baseado na sequência da VP4, foi adotado como padrão para a diferenciação VP4 (TANIGUCHI, 1995) (Tabela 1).

A glicoproteína VP7 é o principal antígeno indutor de anticorpos neutralizantes, sendo codificada pelos segmentos gênicos 7, 8 ou 9, dependendo da linhagem viral (DESSELBERGER e McCRAE, 1994).

A proteína VP4 tem atividade hemaglutinante (KALICA et al., 1983), importante na infectividade viral e tem sido utilizada como marcador de virulência, além disso, mantém epitopos de neutralização-específica (DESSELBERGER e McCRAE, 1994). Ela precisa ser clivada proteoliticamente em VP5 e VP8 por ação da tripsina para garantir a infectividade do vírion, e é codificada pelo segmento gênico 4 (DESSELBERGER e McCRAE, 1994).

A proteína VP6 é codificada pelos segmentos gênicos 6 (grupo A) ou 5 (grupo C), e é altamente imunogênica, porém, sendo uma proteína interna, ela não está prontamente disponível para ser reconhecida pelos anticorpos a ela dirigidos (BOTH et al., 1994). Assim, é geralmente aceito que os anticorpos dirigidos contra o antígeno de grupo não sejam neutralizantes (HART e CUNLIFFE, 1999). Contudo, em camundongos, há evidências que IgA anti-VP6 tem efeito protetor (BURNS et al., 1996; FENG et al., 1997).

Dentre os sete diferentes grupos de rotavírus, somente os sorogrupos A, B e C causam doença em humanos (SAIF, 1990; FANG et al., 1989; BRIDGER et al., 1986). As rotaviruses causadas pelos rotavírus do grupo A são as mais importantes e a causa mais comum de gastroenterites virais agudas em crianças (deZOYSA E FEACHEN, 1985). Estes

vírus provocam desidratação severa em 20% a 70% dos pacientes hospitalizados com diarreia, no mundo todo (KAPIKIAN E CHANOCK, 1996; COOK et al., 1990). Usando um sistema de classificação baseado nas reações de sorotipagem com antígenos VP7 e VP4, foram definidos 14 sorotipos G e 20 sorotipos P para rotavírus do grupo A (ESTES et al., 1996a). A distribuição mundial mais comum dos sorotipos G são de G-1 a G-4, sendo o G-1 predominante durante as duas últimas décadas, e os sorotipos P mais comuns são P4 e P8 (BISHOP, 1996). Ainda, em qualquer tempo ou local, há co-circulação destes e dos tipos menos comuns, especialmente nos países em desenvolvimento. Diversidades adicionais, resultantes de mutações genéticas, rearranjos gênicos entre diferentes sorotipos e entre linhagens humanas e animais foram descritas (BISHOP, 1996a).

Os rotavírus do grupo B foram inicialmente detectados em bovinos e porcos, mas em 1984 estes agentes foram também associados com grandes epidemias de diarreia severa entre crianças e adultos na China (HUNGT et al., 1984; FANG et al., 1989). Os rotavírus do grupo C foram pela primeira vez isolados a partir de fezes de porcos com diarreia severa nos EUA (SAIF et al., 1980), e foram, subseqüentemente, identificados por BRIGER et al., em 1986 como patógenos humanos.

Alguns estudos têm demonstrado que as infecções causadas pelo rotavírus do grupo A parecem ser mais severas do que aquelas causadas pelos rotavírus do grupo C, a julgar pelo número relativo de pacientes que requerem hospitalização e tratamento com fluido intravenoso (ISHIMARU et al., 1990; JIANG et al., 1995; NILSSON et al., 2000a).

Tabela 1: Designação das proteínas e função/fenótipos associados aos segmentos genômicos, e tipo de classificação que conferem aos rotavírus

Segmentos genômicos*	Proteína codificada*	Funções/ fenótipos	Confere tipagem	Confere sub-tipagem
1	VP1	RNA Polimerase		
2	VP2	Ligação de RNA não-específica		
3	VP3	Guanililtransferase		
4	VP4	Hemaglutinação Antígeno indutor de anticorpos neutralizantes Infectividade protease-realçada Virulência Ligação à cél. hospedeira	Sorotipos P1 -P20 Genotipos VP4**	
5	NSP1	Ligação de mRNA viral específica		
6	VP6	Antígeno de grupo	Grupos A B C D E F G	Subgrupos I, II, não I não II, I+II
7	NSP2	Ligação 3'-específico de mRNA	Sorotipos G1- G14	
8	NSP3	I Ligação de RNA não-específica		
9	VP7	Glicoproteína capsídio externo neutralização antigénica		
10	NSP4	Morfogénese do vírion		
11	NSP5/6	Ligação do RNA ?		

Adaptada de Raming (1997)

*As codificações mostradas são para rotavírus do grupo A da linhagem SA11

**baseado na sequência de nucleotídeos do gene que codifica VP4

1.2.2. Patogénese

Os rotavírus entram no hospedeiro primariamente através da ingestão oral (a dose infecciosa é aproximadamente 100 partículas virais [HART e CUNLIFFE,1999]). Estes vírus são altamente infecciosos, e a replicação pode ocorrer com até 10 TCID₅₀ (WARD et al., 1986). O vírion intacto liga-se às células do epitélio colunar nas extremidades das pequenas vilosidades intestinais e rapidamente alcançam o íleo (GREENBERG et al., 1994), sendo que as células da cripta são poupadas. A entrada do vírus nas células do hospedeiro é mediada pela VP4, que é clivada em VP8 e VP5. Uma vez no interior da célula, ocorre a replicação viral exclusivamente no citoplasma e no retículo endoplasmático, com a participação de RNA polimerase dependente RNA, das VP1, 2 e 3 e das NSP1,2 ,3 e 5

(HART e CUNLIFFE,1999). A lise das células ocorre quando as proteínas do capsídio são incorporadas à partícula viral (STEELE, 1999).

A infecção por rotavírus leva a uma mudança nas vilosidades do epitélio do intestino delgado da forma colunar a cuboidal, encurtando-as (GREENBERG et al., 1994). Pelo menos três diferentes mecanismos já foram descritos para a patogênese da diarreia (HART e CUNLIFFE,1999). Nos estágios iniciais da infecção, os enterócitos não são mortos pelos rotavírus, mas os níveis de algumas enzimas como sucrase, lactase e maltase são consideravelmente reduzidos (GREENBERG et al., 1994). Devido ao fato de que os dissacarídeos, lactose e maltose precisam ser clivados a monossacarídeos, este decréscimo resulta num acúmulo de dissacarídeos no lúmen e numa diarreia osmótica (HART e CUNLIFFE,1999). Além disso, a NSP4 do vírus é capaz de aumentar as concentrações de cálcio intracelular (BALL et al., 1996; ZANG et al., 1998), o que causa um efluxo de cloro, sódio e água, resultando em diarreia secretória (HART e CUNLIFFE,1999). O reparo do dano epitelial inicia e a taxa de enterócitos maduros com vilosidades infectadas excede a taxa de produção de novos enterócitos nas criptas. Isto resulta no embotamento das vilosidades e na hiperplasia de células da cripta. As células imaturas da cripta são naturalmente secretoras (DESSELBERGER, 1998), o que contribui para a sintomatologia, e esse excesso de secreção, juntamente com a perda da absorvidade, resulta em diarreia (HART e CUNLIFFE,1999).

1.2.3 Transmissão

A replicação dos rotavírus no trato intestinal pode resultar na liberação de mais do que 10^{12} partículas virais/g de fezes. Estes vírus são altamente infecciosos quando transmitidos para uma mesma espécie, como por exemplo, de humano para humano (BISHOP, 1996a). São vírus muito estáveis no meio ambiente e podem permanecer viáveis nas mãos por pelo menos 4 horas, além de serem capazes de sobreviver várias semanas em superfícies e em água potável e recreacional (ANSARI et al., 1991). Em locais onde não há tratamento de esgoto, eles também podem ser transmitidos via água contaminada com material fecal (ANSARI et al., 1991). HURST E GERBA (1980) demonstraram a sobrevivência do rotavírus símio SA11 em águas doces e estuarinas por diversos dias a 20°C, especialmente em águas muito contaminadas com esgoto. Segundo PANCORPO et al., (1987) e RAPHAEL et al., (1985), os rotavírus podem persistir em águas de superfície

entre 8 e 32 dias ou por mais de 64 dias em águas potáveis. Em águas de rios, rotavírus isolados de animais e humanos sobreviveram por 32 dias a 4°C ou por 10 dias a 20°C (RAPHAEL et al., 1985; PANCORPO et al., 1987). Além disso, os rotavírus são estáveis mesmo após a pasteurização do leite (15 s a 80°C) (BENKADDOUR et al., 1993) e numa faixa de pH de 3 a 9 (ESTES, 1996).

A liberação viral nas fezes inicia antes do desenvolvimento sintomático, e crianças podem estar liberando vírus até 48 horas antes de apresentar os sintomas (PICKERING et al., 1988). Altas taxas de liberação de rotavírus foram relatados para crianças jovens. A liberação de partículas virais nas fezes dura em média 4 dias, embora a excreção do vírus por mais de 30 dias tenha sido relatada para pacientes imunocomprometidos (DENNEHY, 2000). A liberação pré-sintomática e as altas taxas de infecções assintomáticas podem ser os mais importantes fatores na introdução e transmissão dos rotavírus (DENNEHY, 2000).

Investigadores têm encontrado rotavírus em recipientes de fraldas descartáveis, brinquedos, torneiras, fraldários, áreas de lavagem das mãos e até em áreas de preparo de alimentos (KESWICK et al., 1983; WILDE et al., 1992), demonstrando que estes podem espalhar-se por toda casa ou creche, e não apenas em áreas diretamente contaminadas com fezes (DENNEHY, 2000). A transmissão do rotavírus em uma comunidade susceptível pode ocorrer de forma extremamente rápida. Por exemplo, numa epidemia ocorrida em Truk Atoll no Pacífico, a infecção por rotavírus envolveu pelo menos 31% da população da ilha no período de uma semana (FOSTER et al., 1980). Frequentemente, o vírus ocorre em surtos explosivos (BISHOP, 1996a; DENNEHY, 2000).

Altas taxas de infecções nosocomiais tem sido registradas na maioria dos hospitais pediátricos e creches (BARLETT et al., 1985; PICKERING et al., 1988). Os achados preliminares de RNA de rotavírus em amostras de ar de quartos de crianças hospitalizadas com infecção por estes agentes sugerem que a principal rota de transmissão dos rotavírus em hospitais e creches possa ser a transmissão pelo ar. (BISHOP, 1996a; DENNEHY et al., 1998; DENNEHY, 2000). O mais provável é que as infecções resultem da transmissão pelo ar após a formação de partículas aerossóis, como por exemplo de fraldas ou descargas de banheiro (BISHOP, 1996a). Contudo, os rotavírus têm sido detectados em secreções respiratórias em um pequeno número de pacientes (FRANGOSO et al., 1986; ZHENG et al., 1991a) e alguns casos associados de pneumonia têm sido descritos (SANTOS et al., 1983; ZHAORI et al., 1991). Além disto alguns estudos relatam a presença de sintomas respiratórios e otite média em 50% dos pacientes com rotavírus (GOLDWATER et al., 1979).

1.2.4 Doença e complicações

A infecção por rotavírus tem um período de incubação curto de 1 a 3 dias (PICKERING et al., 1988) e é caracterizada por início abrupto com febre seguido de diarreia aquosa (BISHOP, 1983).

A doença causada por rotavírus do grupo A pode variar de uma infecção assintomática a diarreia média e severa até doença fatal. As infecções assintomáticas são freqüentes em neonatos e também é comum em crianças mais velhas e adultos. Nos pacientes sintomáticos, a diarreia começa geralmente entre 24 e 72 horas após a infecção e dura de 5 a 8 dias (BASS e GREENBERG, 1995). A maioria dos pacientes apresenta febre, sendo que vômitos e desidratação são comuns (KAPIKIAN et al., 1996b). Estudos laboratoriais refletem estes sintomas com acidose metabólica e elevação da uréia e sódio séricos (BASS e GREENBERG, 1995). Quando necessário, o período médio de hospitalização é, geralmente, de 4 dias. Nos casos fatais a morte usualmente ocorre de 1 a 3 dias após o início súbito dos sintomas, como resultado da desidratação e subsequente desequilíbrio eletrolítico (STEELE, 1999).

A doença causada pelo grupo C geralmente é acompanhada por dor abdominal, vômitos e febre, enquanto que a diarreia é observada em somente 25% dos pacientes (MACKOW et al., 1995).

Virtualmente, todas as crianças são infectadas nos primeiros 3 a 5 anos de idade, mas a diarreia severa e desidratação ocorre primariamente entre crianças de 3 a 5 meses de idade (GLASS et al., 1996). A maioria das crianças é infectada mais do que uma vez, embora a infecção subsequente tenda a ser mais suave (VELAZQUEZ et al., 1996). A imunidade protetora adquirida da infecção é incompleta, e foi relatado que esta imunidade é mais eficaz nos casos de infecções moderadas e severas do que em infecções brandas (DENNEHY, 2000).

Sugere-se a possibilidade de que o rotavírus do grupo C possa também estar correlacionado com a incidência de atresia biliar extrahepática (EHBA) (RIPENHOFF-TALTY et al., 1996), que consiste na incapacidade de eliminar a bile, devido às más-formações da árvore biliar. Estas anomalias aparentemente congênitas podem ser adquiridas através de um processo infeccioso intra-uterino (SHERLOCK, 1988). A EHBA, juntamente com a hepatite neonatal, constituem $\frac{3}{4}$ dos casos de colestase, e é a forma mais comum de doença hepática que afeta lactentes. É uma doença de prognóstico grave, que necessita intervenção

cirúrgica obrigatória e, muitas vezes, até mesmo transplante de fígado (RIPENHOFF-TALTY et al., 1996). Porém, outro estudo não confirmou o papel do rotavírus do grupo C como agente etiopatológico da EHBA, sugerindo que futuras investigações sobre a etiologia da EHBA deve incluir a resposta imune do hospedeiro tanto quanto a pesquisa por novos agentes etiológicos (BOBO et al., 1997).

Embora raras, algumas outras doenças têm sido correlacionadas com as infecções por rotavírus, e estas incluem: miosite aguda (BONNO et al., 1998), linfocitose (TAKAHASHI et al., 1999), paralisia semelhante aquela causada pelos vírus da poliomielite (CHOU et al., 1998) e encefalites (HONGOU et al., 1998).

1.2.5 Terapia

Atualmente, a terapia para a doença rotaviral é de suporte. A reposição de fluidos e eletrólitos perdidos pela diarreia e vômitos é de vital importância. Embora a administração intravenosa de fluidos seja a ideal, a mesma é impraticável em muitos países em desenvolvimento, o que tem levado a várias formulações de sais de rehidratação oral; sendo que aquelas que contêm glicose são preferíveis (KAPIKIAN et al., 1996a). Uma fórmula padrão sugerida pela OMS de eletrólitos e glicose de administração oral foi desenvolvida e tem se mostrado segura e efetiva. Fórmulas "aperfeiçoadas" que contêm uma base de arroz ou suplementos adicionais têm sido estudadas, mas parecem oferecer menos vantagens do que a fórmula padrão (KAPIKIAN et al., 1996a).

Freqüentemente, os alimentos não são permitidos aos pacientes com diarreia a fim de reduzir a quantidade de fezes, mas isto pode levar a má-nutrição em casos severos e prolongados. A recomendação corrente é retomar a alimentação tão logo a rehidratação oral seja concluída (BASS et al., 1995). A amamentação em lactentes deve continuar durante o tratamento e pode oferecer alguma proteção através da transferência de anticorpos maternos.

Outras formas de imunoterapia tem sido estudadas e parecem oferecer alguma vantagem, particularmente em indivíduos imunocomprometidos (KAPIKIAN et al., 1996a; GUARINO et al., 1991). Bacterioterapia com formulações contendo lactobacillus podem diminuir a duração da diarreia (SHORNIKOVA et al., 1997). Em adição, a rehidratação oral com salicilato de bismuto parece ser uma opção terapêutica adjunta efetiva (SORIANO-BRUCHER et al., 1991).

Fármacos antidiarréicos são contra-indicados no tratamento da doença diarréica, além de não oferecem benefícios, podem ser perigosos (WHO, 1990). Similarmente, antieméticos e antibióticos não oferecem benefícios. Apesar destas recomendações, estudos tem demonstrado o uso de terapias inadequadas para estes agentes em mais do que 20% dos pacientes admitidos em hospitais (FERSON e HENRY, 1998).

1.2.6 Prevenção

Melhorias nas condições sanitárias e de vida em países em desenvolvimento podem ser promissoras para diminuir o impacto da doença. Porém, mesmo quando estes fatores estão em condições adequadas a doença pode espalhar-se rapidamente (STEELE, 1999). Isto leva a extensivos esforços para o desenvolvimento e testes de vacinas efetivas em humanos e animais (CLARK et al., 1996; CONNER et al., 1996; HERRMANN et al., 1996; KAPIKIAN et al., 1996b; SAIF e FERNANDEZ, 1996; NEWBURY et al., 1998). Extensas revisões têm sido feitas e questões crescem sobre a provável eficácia das formulações atualmente disponíveis (ESTES, 1996). Uma vacina de sucesso precisa estimular a imunidade humoral e a mediada por células localmente no intestino e, no mínimo, precisa garantir proteção contra os quatro sorotipos prevalentes do rotavírus do grupo A (STEELE, 1999). Apesar dos relatos favoráveis às vacinas, um número de problemas concernentes ao uso rotineiro das mesmas ainda permanecem, especialmente em países em desenvolvimento (HART e CUNLIFFE, 1999), onde a eficácia em estimular a formação de anticorpos contra sorotipos prevalentes nestes países não foi ainda satisfatoriamente estabelecida (ESTES, 1996). Além disso, o custo estimado em 28 dólares/criança parece ser o maior impedimento, uma vez que este valor excede o orçamento destinado à saúde per capita na maioria dos países em desenvolvimento (HART e CUNLIFFE, 1999). Permanece a ser determinado se o desenvolvimento de vacinas é justificado para rotavírus de outros grupos que não o grupo A (SAIF e JIANG, 1994b).

Vacinas para a prevenção da infecção não estão atualmente disponíveis. Uma vacina para rotavírus, RotaShield, licenciada em 1998 nos EUA, foi voluntariamente retirada do mercado americano em outubro de 1999, após uma revisão de inúmeros estudos científicos que sugeriam que a intussuscepção (captação de uma parte da alça intestinal dentro da outra [ARAÚJO et al., 1996]) ocorreu com uma significativa frequência em 1 a 2 semanas após a vacinação (WITHDRAWAL, 1999). Por essas razões, a licença foi suspensa em

novembro de 1999 (HART e CUNLIFFE, 1999).

O meio primário para prevenir a infecção por rotavírus envolve controle de medidas (WITHDRAWAL, 1999), necessitando driblar as dificuldades em remover os rotavírus das mãos ou de superfícies contaminadas. Esses vírus são relativamente resistentes à inativação por desinfetantes químicos e antissépticos comumente usados em hospitais e outras instituições (ANSARI et al., 1991). As superfícies devem ser desinfetadas com agentes efetivos como gluconato de clorexidina, sais quaternários de amônio e orto-fenilfenol em formulações que contenham alta concentração de álcool (DENNEHY, 2000). A lavagem das mãos com sabão comum não é efetiva contra os rotavírus e pode ainda espalhá-los por maior área nas mãos (ANSARI et al., 1991). Nenhum desinfetante normalmente utilizado para lavagem das mãos inativa completamente estes vírus no tempo normal de lavagem. Esta deve ser realizada com um agente de limpeza contendo álcool antes e depois do contato com uma criança ou área infectada (DENNEHY, 2000).

A amamentação é o mais simples e principal meio prontamente disponível para prevenir ou amenizar a infecção por rotavírus. Isto é particularmente um resultado de IgA específica no leite, mas outros componentes do leite também inibem a replicação dos rotavírus (HART e CUNLIFFE, 1999). Lactadherina, uma glicoproteína mucina-associada que inibe a replicação do rotavírus *in vitro*, que está presente em altas concentrações no leite (484 mg/mL), foi associada com infecção assintomática por rotavírus num lactente (NEWBURY et al., 1998). A concentração da proteína em crianças que desenvolveram doença sintomática foi de 29,2 mg/mL.

1.3 A Epidemiologia

(ROUQUAYROL, 1994; FORATTINI, 1996; LEAVEL E CLARK, 1976)

Uma definição precisa do termo epidemiologia não é fácil: sua temática é dinâmica e seu objeto complexo. Pode-se, de uma maneira simplificada, conceituá-la como: ciência que estuda o processo saúde-doença em coletividades humanas, analisando a distribuição e os fatores determinantes das enfermidades, danos à saúde e eventos associados à saúde coletiva, propondo medidas específicas de prevenção, controle, ou erradicação de doenças, e fornecendo indicadores que sirvam de suporte ao planejamento, administração e avaliação das ações de saúde. *A priori*, independente de qualquer análise, pode ser dito que a atenção da epidemiologia está voltada para as ocorrências, em escala massiva, de doença e não-doença envolvendo pessoas agregadas em sociedades, comunidades, grupos demográficos, classes sociais ou quaisquer outros coletivos formados por seres humanos.

A epidemiologia é o eixo da saúde pública. Proporciona as bases para a avaliação das medidas de profilaxia, fornece pistas para a diagnose de doenças transmissíveis e não transmissíveis e enseja a verificação da consistência de hipóteses de causalidade. Além disso, estuda a distribuição da morbidade e da mortalidade a fim de traçar o perfil de saúde-doença nas coletividades humanas; realiza testes de eficácia e de inocuidade de vacinas; desenvolve a vigilância epidemiológica; analisa os fatores ambientais e sócio-econômicos que possam ter alguma influência na eclosão de doenças e nas condições de saúde. Seu fim último é contribuir para a melhoria da qualidade de vida e o soerguimento do nível de saúde das coletividades humanas.

A epidemiologia e a saúde pública são indissociáveis quanto aos seus objetivos sociais e quanto à sua prática. A saúde pública intervém buscando evitar doenças, prolongar a vida e desenvolver a saúde física e mental e a eficiência. A prevenção se faz com base no conhecimento da História Natural da Doença.

História Natural da Doença é o nome dado ao conjunto de processos interativos compreendendo as inter-relações do agente, do susceptível e do meio ambiente que afetam o processo global e seu desenvolvimento, desde as primeiras forças que criam o estímulo patológico no meio ambiente, ou em qualquer outro lugar, passando pela resposta do homem ao estímulo, até às alterações que levam a um defeito, invalidez, recuperação ou morte. A História Natural da Doença tem desenvolvimento em dois períodos sequenciados: o período epidemiológico ou de pré-patogênese, e o período de patogênese. No primeiro, o

interesse é dirigido para as relações susceptível-ambiente; no segundo, interessam as modificações que se passam no organismo vivo.

O primeiro período da História Natural (período pré-patogênico) é a própria evolução das inter-relações dinâmicas que envolvem, de um lado, os fatores próprios do susceptível (o homem), e de outro, os condicionantes sócio-econômico-culturais de fatores ambientais, que estimulam o desenvolvimento da enfermidade. É também a descrição desta evolução. Ao se considerar as condições para que a doença tenha início em um indivíduo susceptível, é necessário ter-se em conta que nenhuma delas será, por si só, suficiente. A eclosão da doença é, na verdade, dependente da estruturação dos fatores contribuintes. A estruturação dos fatores contribuintes é denominada multifatorialidade, a qual não é um simples resultado de justaposição. A associação dos fatores é sinérgica, isto é, dois fatores estruturados aumentam o risco de doença mais do que a sua simples soma. O estado final provocador de doença é portanto, resultado da sinergização de uma multiplicidade de fatores políticos, econômicos, sociais, culturais, psicológicos, genéticos, biológicos, físicos e químicos. O estudo das diarreias propicia uma boa ilustração da estruturação sinérgica dos fatores que conduzem à doença e a mantêm (Fig. 3). Destaca-se em posição central a interação sinérgica entre a síndrome diarreica e a desnutrição. BEHAR (1976) chama a atenção para a magnitude deste problema, dando ênfase ao fato de que as infecções entéricas constituem fatores precipitantes e agravantes da desnutrição e esta, por sua vez, influi na patogenia dos processos diarreicos. Segundo este autor, essa interação explica a razão pela qual as doenças diarreicas constituem a causa básica mais importante da mortalidade na infância. O entendimento da existência do sinergismo multifatorial é importante, mas não deve obnubilizar a causa mais profunda da manutenção do *status quo* da morbidade por diarreias, a qual reside no desnível econômico existente entre as classes sociais.

O segundo período da história natural da doença é relacionado com a sua implantação e evolução no homem. É o período da patogênese. Este período se inicia com as primeiras ações que os agentes patogênicos exercem sobre o ser afetado. Seguem-se as perturbações bioquímicas em nível celular, continuam com as perturbações na forma e na função, evoluindo para defeitos permanentes, cronicidade, morte ou cura. Procura-se aqui, os fatores determinantes que, no quadro geral da história natural da doença, são inerentes ao organismo e estabelecem a receptividade do indivíduo. Estão compreendidas características como idade, sexo, patrimônio gênico, condições fisiológicas, e os mecanismos de defesa que incluem as experiências imunológicas prévias.

Em outra oportunidade foi enfatizado que a Epidemiologia, em sua determinação histórica e conceitual, tem como definidor do seu objeto de conhecimento o coletivo de seres humanos. Assim sendo, no que se refere a metodologia da pesquisa epidemiológica, os estudos experimentais são de utilização bastante limitada visto os mesmos consistem na manipulação de populações humanas, o seu uso é praticamente restrito ao teste de vacinas, ou de medicação em massa, introduzindo-se ou suprimindo-se esses fatores em conjuntos populacionais previamente selecionados. Em vista disso, a observação constitui o procedimento mais empregado na metodologia epidemiológica, e se fundamenta na coleta de informações úteis que possam identificar as circunstâncias e os fatores determinantes da doença em estudo. Os dados necessários são obtidos de duas maneiras essenciais. Ou são colhidos em registros de rotina, ou são decorrentes da realização de levantamentos previamente planejados com essa finalidade, estes podem ser realizados de duas maneiras: através de estudos de coorte, também chamados de estudos longitudinais ou prospectivos; e através de estudos de casos controles. Os estudos de coorte baseiam-se na observação de determinado grupo de pessoas através do tempo, com o objetivo de estabelecer as possíveis associações entre a exposição e a frequência no aparecimento da doença. Esse conjunto é rotulado, genericamente de coorte, e, em se tratando pois, de segui-la no tempo, há duas maneiras de fazê-lo. Na primeira, planeja-se acompanhar o grupo no futuro (estudo prospectivo), uma vez caracterizado de acordo com o atributo que interessa, registrando-se o aparecimento da doença e procurando-se associá-lo com esse fator em estudo. Na segunda (estudo retrospectivo), o conjunto de pessoas é investigado em relação aos acontecimentos passados, tanto no que concerne à frequência na ocorrência da doença como na do fator a ser pesquisado. É lícito, pois, estabelecer que uma coorte pode ser estudada sob o ponto de vista longitudinal, tanto prospectiva como retrospectivamente. Os estudos de coorte são os únicos capazes de abordar hipóteses etiológicas produzindo medidas de incidência, e por conseguinte, medidas diretas de risco.

O entendimento da trama epidemiológica, bem como os motivos de sua instalação e a compreensão da natureza dos meios de que se deve lançar mão para solucionar os problemas, formam o objeto das atividades de prevenção das doenças como uma das metas na melhoria das condições de vida da comunidade.

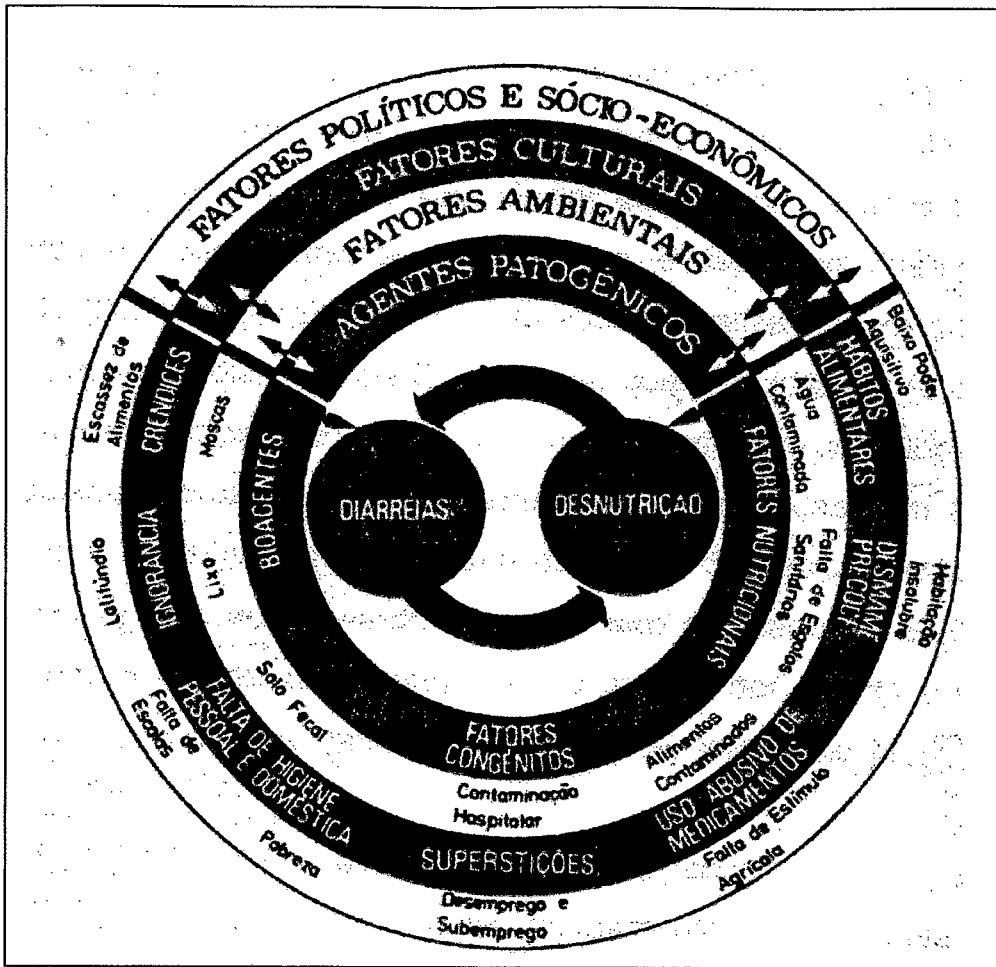


Fig. 3. Sinergismo multifatorial na produção e manutenção das doenças diarreicas. A seta bisagitada (\leftrightarrow) indica que um dos fatores, além de produzir efeito por si, age ainda dando realce à contribuição causal do outro fator e vice-versa, completando o mecanismo sinérgico. Adaptado de Rouquayrol, 1994.

1.3.1 Epidemiologia do Rotavírus

Mundialmente, o rotavírus é o mais importante agente etiológico causador de gastroenterites severas em crianças menores de 5 anos de idade (KAPIKIAN et al., 1990). Os rotavírus infectam primariamente lactentes e crianças jovens, com mais de 90% das crianças soroconvertendo entre 3 e 4 anos de idade. O pico de incidência principal é relatado entre 6 meses e 2 anos de idade, embora jovens lactentes e, crianças mais velhas e adultos sejam também vulneráveis (BASS e GREENBERG, 1995). Pacientes

imunocomprometidos apresentam um risco maior em contrair a doença e freqüentemente é de mais longa duração (STEELE, 1999).

A doença é universal, afetando 95% das crianças menores de 5 anos, independente das condições sócio-econômicas e ambientais (KAPIKIAN et al., 1990). Contudo, as consequências da doença causada por rotavírus em países em desenvolvimento é muito diferente daquelas em países desenvolvidos. Embora a incidência da morbidade relatada para rotavirose em crianças jovens seja similar em ambos os tipos de países (BISHOP, 1993), a doença é freqüentemente mais severa e fatal em crianças dos países em desenvolvimento (PÉREZ-SCHEL, 1996). Um estudo realizado para quantificar o papel do rotavírus como causa de diarreia nos EUA relatou que a incidência de diarreia por rotavírus pode alcançar 0,3 episódios/criança/ano durante os primeiros dois anos de vida, com uma incidência cumulativa aproximada de 0,8 episódios em crianças com até 5 anos de idade (RODRIGUEZ et al., 1987). Nos EUA, cerca de 1 em 73 crianças serão hospitalizadas por diarreia causada por rotavírus levando a um número estimado de 55.000 hospitalizações. Estima-se que possa ocorrer uma média de 20 mortes por ano (1 por 200.000 nascidos vivos) em um subgrupo de crianças de saúde instável, tais como prematuros (KILGORE et al., 1995).

Em climas temperados a doença é mais comum nos meses frios, quando provavelmente a propagação ocorre mais rapidamente nas famílias e na comunidade (BISHOP, 1996a). Nos EUA, as infecções por rotavírus mostram um curioso, mas repetido padrão sazonal, com a atividade viral iniciando aparentemente no sudeste, no outono, e se estendendo através do país até o nordeste, do meio ao final da primavera (CDC, 1997). Este padrão, entretanto, não é consistentemente observado em outras partes do mundo. Em outros países de clima temperado, o pico sazonal varia consideravelmente do outono à primavera (COOK et al., 1990); por exemplo, os picos anuais na Espanha são em dezembro, na França em fevereiro, no Reino Unido em fevereiro e março e na Holanda e Finlândia em março (KOOPMANS E BROWN, 1999); enquanto que no Brasil (STEWIEN et al., 1991), como em outros países tropicais, não existe padrão sazonal distinto (COOK et al., 1990).

1.3.2 Epidemiologia do Rotavírus do Grupo C

Enquanto os rotavírus do grupo A são rotineiramente detectados por ELISA (JAMES et al., 1998) ou por outros métodos comercialmente disponíveis, o que disponibiliza dados

laboratoriais sobre a incidência deste grupo, a incidência de gastroenterites causadas por rotavírus do grupo C em humanos permanece obscura devido à falta de sensibilidade dos métodos de diagnóstico (JIANG et al., 1995). As taxas de detecção do rotavírus do grupo C em humanos têm permanecido baixas (BARNES et al., 1998). Porém, em 1991, pesquisadores japoneses estimaram que anticorpos dirigidos contra rotavírus do grupo C estão presentes em 3 a 45% da população humana em certas localizações geográficas (ISHIMARU et al., 1991). JAMES et al. (1997), investigando a soroprevalência de anticorpos humanos para rotavírus do grupo C através do uso do antígeno VP6 recombinante, expresso em células de insetos, mostrou que, numa amostragem de 1.000 soros humanos de todas as faixas etárias da população do Reino Unido, os anticorpos foram detectados por ELISA em 43,4% da população com um máximo de 66% no grupo de 71 a 75 anos de idade. A taxa de soroprevalência de anticorpos dirigidos contra rotavírus do grupo C encontrada na população sueca, em um estudo realizado no ano de 2000, foi de 30 a 45% (NILSSON et al., 2000a). Assim, a prevalência de anticorpos para rotavírus do grupo C foi inesperadamente alta, considerando a baixa taxa de detecção dos mesmos em amostras clínicas de casos de doenças gastrointestinais. Isto sugere, além da eficácia da metodologia, que as infecções causadas por rotavírus do grupo C são menos severas do que aquelas causadas por rotavírus do grupo A e que aquelas infecções geralmente não são investigadas (JAMES et al., 1997). Ainda, esta aparente discrepância entre dados sorológicos e a baixa ou a nula taxa de rotavírus do grupo C em fezes humanas pode ser devido ao fato de que a pesquisa deste agente etiológico ter sido feita em amostras de lactentes e de jovens crianças, as quais não são necessariamente o alvo primário da infecções sintomáticas do rotavírus grupo C (TSUNEMITSU et al., 1992a).

Há inúmeros relatos de rotavírus do grupo C causando surtos esporádicos de diarreia aguda em crianças e animais em muitos países, entre eles: Finlândia (von BONSDORFF e SVENSSON, 1988), Índia (BROWN et al., 1988), China (CHEN et al., 1988), Brasil (GABBAY et al., 1989), EUA (JIANG et al., 1995), Austrália (JIANG et al., 1996), Japão (OISHI et al., 1993), Tailândia (PENARANDA et al., 1989), Inglaterra (PENARANDA et al., 1989), Malásia (RASOOL et al., 1994) e Argentina (CASTELLO et al., 2000). No Brasil, a presença destes vírus infectando humanos foram relatados no Rio de Janeiro/RJ (PEREIRA et al., 1983), Belém/PA (GABBAY et al., 1989), São Paulo/SP (TIMENETSKI et al., 1993), Valentim Gentil/SP (SOUZA et al., 1998), Goiânia/GO (CARDOSO, 1997), Londrina/PR (ALFIERI et al., 1999) e Distrito Federal (TEIXEIRA et al., 1998).

(CARDOSO, 1997), Londrina/PR (ALFIERI et al., 1999) e Distrito Federal (TEIXEIRA et al., 1998).

Os rotavírus do grupo C também vem sendo isolados de amostras fecais de porcos infectados na Austrália (NAGESHA et al., 1988), Canadá (MORIN et al., 1990), Nova Zelândia (FU, 1987) e Estados Unidos (SAIF et al., 1980; SAIF e JIANG, 1994a), e de bovinos no Japão (TSUNEMITSU et al., 1991). Devido a prevalência destes vírus em porcos e nos bovinos, estes animais podem servir como reservatório para infecções humanas ou para interagir geneticamente com linhagens humanas em infecções cruzadas (BISHOP, 1996a).

Embora o reservatório natural dos rotavírus do grupo C humano seja desconhecido, estudos sorológicos (TSUNEMITSU et al., 1992a), bem como os inúmeros casos de surtos de diarreia aguda, ocorridos na última década, entre adultos na Ásia, Estados Unidos e Europa, sugerem que o rotavírus do grupo C pode ser um patógeno entérico emergente em idosos humanos e em animais (KIM et al., 1999). Estudos prévios têm descrito os rotavírus do grupo C infectando crianças mais velhas ou adultos, porém trabalhos recentes mostram que estes vírus podem também ser encontrados em amostras fecais de lactentes com diarreia (TSUNEMITSU et al., 1992a).

1.4 Diagnóstico dos rotavírus do grupo C

A carência de testes específicos para detecção de rotavírus pertencentes aos grupos B e C contribui, em larga escala, para a alta proporção de casos de diarreia de etiologia desconhecida (SOUZA et al., 1998).

Os rotavírus do grupo C são extremamente difíceis de serem detectados através de procedimentos de rotina, e antes de 1995 não haviam sido detectados em humanos nos Estados Unidos. Isto porque esses vírus não são reativos em testes de ELISA comum para rotavírus grupo do A, e as técnicas moleculares como PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida) ou RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa) com iniciadores específicos para grupo C não têm sido amplamente utilizadas. Conseqüentemente, estes vírus somente poderiam ser detectados em laboratórios de pesquisa com interesse específico no estudo destes agentes (JIANG et al., 1995).

A PAGE pode ser usada como um método de detecção de rotavírus do grupo C para visualiza-se o perfil característico dos 11 segmentos genômicos dispostos no padrão 4-3-2-2 (o que difere do perfil consistente com o grupo A, a saber: 4-2-3-2) (PENARANDA et al., 1989). Em vista disso, este método é freqüentemente utilizado em estudos epidemiológicos de infecções por rotavírus em humanos e animais para discriminar diferenças entre grupos e linhagens (MARKOWSKA-DANIEL et al., 1996). Porém, alguns autores consideram que esta técnica poderia subestimar a verdadeira taxa de detecção destes vírus (JIANG et al., 1995; DIMITROV e SHINDAROV, R.S., 1986), considerando que esta análise requer a presença de 10^8 a 10^{10} partículas virais /mL de fezes para um resultado positivo (KUZUYA et al., 1996; ISHIMARU et al., 1990).

Os rotavírus do grupo C dificilmente propagam-se em cultura de células, tornando este método diagnóstico inviável para sua detecção. Porém, dois sorotipos do rotavírus do grupo C de origem animal (bovino e suíno-Cowden) foram adaptados para replicação em cultura de células (TSUNEMITSU et al., 1991; SAIF et al., 1988). Recentemente, rotavírus do grupo C humanos foram adaptados em cultura (JAMES et al., 1997; SHINOZAKI et al., 1996). Todavia, a cultura requer 4µg de tripsina/ mL (o que danifica a cultura celular rapidamente), e a produção viral é pobre (JAMES et al., 1998).

O diagnóstico em muitos países é dependente da ME (JAMES et al., 1998). Porém, o fato de que os rotavírus do grupo C possuem a mesma morfologia que os rotavírus pertencentes aos grupos A e B, desqualifica a ME como ferramenta diagnóstica para

discriminar este grupo em especial (NILSSON et al., 2000b). No entanto, recentemente, o diagnóstico por ME foi associado com sucesso à eletroferotipagem, mas a ME é viável somente em poucos laboratórios. Além disso, estes métodos são relatados como sendo menos sensíveis do que o RT-PCR ou um ELISA com reagentes baseados na detecção de antígenos do grupo C (JAMES et al., 1998). A introdução de ambos os métodos, possivelmente, poderia ultrapassar alguns dos obstáculos no diagnóstico dos rotavírus do grupo C (NILSSON et al., 2000b).

Dentre os testes de ELISA que têm sido usados no diagnóstico destes vírus encontram-se:

- 1) ELISA sanduíche de captura bilateral de antígeno de grupo C específico (VP6) no qual antisoros hiperimunes policlonais (a imunização foi realizada com diversas linhagens dos grupos A, B e C de origem humana, porcina e bovina, num total de 16 linhagens diferentes) de porcos gnotobióticos dirigidos contra linhagem do rotavírus do grupo C Cowden, adaptados a cultura (designado U 339), agem como anticorpos de captura do antígeno. IgG purificada a partir de um anti-soro para VP6 de rotavírus do grupo C Cowden (U 339) policlonal de porcos age como detector biotinilado de antígenos VP6 imobilizados (TSUNEMITSU et al., 1992b). Contudo, neste teste o soro hiperimune utilizado é dirigido contra a linhagem porcina do rotavírus do grupo C (Cowden) e estudos recentes mostraram que a linhagem Cowden é antigenicamente distinta do rotavírus do grupo C humano (JAMES et al., 1998).

- 2) Um teste de ELISA utilizando anticorpo monoclonal produzido a partir de rotavírus do grupo C humano de amostras fecais (FUJII et al., 1992). Os anticorpos monoclonais reagem com a proteína do capsídeo externo VP7 das linhagens humanas de rotavírus do grupo C. Os genes correspondentes a esta proteína têm uma seqüência altamente conservada de nucleotídeos conforme comprovado em dois estudos (97,8% a 99,8% e 97,1% a 100 % de homologia dos nucleotídeos) (JIANG et al., 1996; GRICE et al., 1994), indicando que eles pertencem ao mesmo genotipo e são provavelmente pertencentes ao mesmo sorotipo. Outros estudos, porém, têm demonstrado algumas diferenças minoritárias entre perfis eletroforéticos das rotavirose do grupo C (FUJII et al., 1992; KUZUYA et al., 1996), demonstrando que estas linhagens mantêm 95.7% de identidade de nucleotídeo (KUZUYA et al., 1996). Além disso, evidências de diversidades sorológicas e genéticas dentro dos rotavírus do grupo C infectando humanos e animais tem sido descritas (JIANG et al., 1991; TSUNEMITSU et al., 1992a). Assim, o diagnóstico baseado nas

proteínas externas do capsídeo, nas quais esta diversidade tem sido demonstrada, pode limitar a detecção a um único sorotipo (JAMES et al., 1998).

3) Em 1998 foi produzido um ELISA de captura de antígeno, para detecção do antígeno de grupo específico (VP6) do rotavírus do grupo C humano em amostras de fezes (JAMES et al., 1998), baseado em reagentes produzidos com o antígeno VP6 recombinante derivado de rotavírus do grupo C humano (JAMES et al., 1997). Pelo uso do VP6 recombinante como imunógeno, todos os rotavírus do grupo C, independente do sorotipo, seriam detectados. Os resultados obtidos nos testes experimentais de validação deste ELISA, mostraram-se equivalentes aos resultados obtidos por RT-PCR (JAMES et al., 1998).

A transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) é o método mais sensível para a detecção do rotavírus do grupo C (JIANG et al., 1995) e é considerado o "padrão ouro" para este procedimento (JAMES et al., 1998). Mais detalhes sobre este método serão vistos a seguir.

1.5 Técnicas Moleculares

1.5.1 RT-PCR

O RT-PCR é um método que permite, após a transcrição reversa do RNA para o seu DNA complementar através da utilização da enzima transcriptase reversa, a amplificação *in vitro* de segmentos do DNA, usando dois iniciadores que hibridizam ou anelam com as fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado (GOUVEA et al., 1991). Neste processo, o DNA é desnaturado (94-96°C), os iniciadores são hibridizados (30-60°C) e, posteriormente, a síntese do DNA é feita em presença de DNA-polimerase e desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs) (72°C) (SCHRANK et al., 1996). A repetição dessas etapas, por 20 a 30 ciclos, permite gerar inúmeras cópias idênticas de um segmento de DNA (SCHRANK et al., 1996). As condições iniciais para a amplificação, tais como concentrações de Mg^{2+} , de enzima e de iniciadores, e a temperatura de anelamento dos iniciadores, devem ser definidas para cada par de iniciador. Os produtos amplificados podem ser observados após corrida eletroforética e coloração com brometo de etídio ou nitrato de prata (HARLOW E LANE, 1988).

Os termos “*semi-nested*” e “*nested*” PCR são utilizados para diferenciar o segmento genômico amplificado, bem como os iniciadores utilizados. Quando dois iniciadores anelam no interior de um segmento genômico já amplificado por uma primeira reação de polimerização em cadeia, para formar um novo produto de amplificação de menor peso molecular, essa reação é denominada *nested* PCR. A *semi-nested* utiliza um iniciador que amplifica o segmento genômico externo (maior) e o segmento genômico interno (menor), ou seja, um iniciador é comum entre a primeira e a segunda reações de PCR.

1.5.1.1 Cuidados na realização do PCR

A habilidade do PCR em produzir um grande número de cópias de uma seqüência gênica a partir de quantidades mínimas de DNA necessita que cuidados extremos sejam tomados para evitar resultados falso-positivos. Embora dados falso-positivos possam resultar de contaminação amostra-amostra, a fonte mais séria de contaminação de falso-positivos é o chamado *carry-over* de DNA a partir de amplificações prévias de um mesmo DNA alvo (o

termo *carry-over* não possui uma tradução literal ou oficial para a língua portuguesa; assim sendo, embora esse termo seja corrente entre os biólogos moleculares, neste trabalho será designado como DNA contaminante). Os seguintes procedimentos minimizam a transferência de DNA previamente amplificado:

- separação física das salas de pré- e pós-amplificação, bem como utilização de um conjunto exclusivo de micropipetas;
- todos os reagentes usados no PCR devem ser preparados, aliquotados e estocados em áreas de pré-amplificação, ou seja, áreas livres de produtos amplificados por PCR. Os reagentes devem ser aliquotados para diminuir o número de pipetagens repetidas num mesmo recipiente;
- micropipetas de dispositivo positivo ou ponteiras equipadas com filtros devem ser utilizadas para reduzir a entrada de aerossóis de DNA ou líquidos no interior ou na extremidade das micropipetas, impedindo assim a contaminação das amostras subsequentes.
- procedimentos laboratoriais meticulosos devem ser adotados: troca freqüente de luvas, rápida centrifugação dos tubos antes da sua abertura, abertura e fechamento cuidadosos dos tubos para evitar formação de aerossóis, manipulação mínima das amostras, e adição de todos os reagentes antes da amostra de DNA;
- escolha criteriosa dos controles: para o controle positivo, a amostra selecionada deve amplificar fraca, mas consistentemente; para o controle negativo, este deve incluir um controle múltiplo de reagentes, que deve conter todos os componentes necessários à amplificação, menos o DNA molde. Este sistema proporciona uma detecção extremamente sensível da presença de contaminantes.

A susceptibilidade à contaminação é facilmente explicada em vista da extrema sensibilidade do PCR; assim, as sugestões listadas aqui servem como guia para a implementação de procedimentos que ajudarão a minimizar, senão erradicar a transferência de DNA contaminante (KWOK, 1990).

Métodos de esterilização, pré- (antes da reação de amplificação) e pós-PCR (após as reações de amplificação), para minimizar a contaminação são também descritos e incluem: irradiações gama (DERAGON et al., 1990) e ultra-violeta (SARKAR E SOMMER, 1991), e digestão com enzima de restrição (ZHU et al., 1991), os quais, segundo relatos prévios, têm sido úteis para a inativação de DNA contaminante nas misturas de PCR anterior a adição

dos DNAs moldes. Ainda, a inativação fotoquímica por tratamento com isopsoraleno DNA (RYS E PERSING, 1993) e a substituição do dTTP por dUTP em todos os produtos de PCR, para posterior tratamento com uracil-DNA glicosilase (RITZLER et al., 1999) foram descritos para a esterilização subsequente dos produtos de PCR.

1.5.2 Subtipagem molecular baseada na seqüência de nucleotídeos

Na epidemiologia de doenças infecciosas é importante a obtenção de dados que possam demonstrar a existência de uma origem comum entre microorganismos isolados de um surto de infecção. Em geral, estes agentes infecciosos são clonais, isto é, originados na progênie de um microorganismo singular e, por isso, geneticamente idênticos ou muito próximos. Em espécies bacterianas, há diversidade genética suficiente para permitir a identificação de diferentes clones ou grupo de clones entre isolados de uma mesma espécie, coletados de diferentes fontes, sítios de infecção ou de diferentes períodos. Isto é chamado subtipagem, e é feita através da análise de um conjunto de características de inúmeros microorganismos isoladas, o que permite a discriminação dos mesmos abaixo do nível de espécie.

A subtipagem de espécies tem ampla aplicação na microbiologia da saúde pública. Ela é essencial, por exemplo, para assegurar que programas de imunização conduzam a erradicação de um patógeno alvo ao invés da substituição por um subtipo variante (SWAMINATHAN, B. & MATAR, G.M., 1993). No caso de agentes virais, esta têm implicação no mecanismo de evasão do vírus ao sistema imune do hospedeiro, uma vez que, a variação genética pode levar a variações antigênicas. Em decorrência, o vírus torna-se insusceptível à imunidade gerada na população por infecções anteriores (ABBAS et al., 2000)

No passado, a subtipagem foi realizada por testes de um ou muitos marcadores fenotípicos (procedimentos de biotipagem, sorotipagem, tipagem de bacteriófagos). Embora estes marcadores sejam ainda amplamente utilizados, eles apresentam inúmeras falhas. Contrariamente, os métodos de subtipagem molecular são baseados na caracterização física de moléculas produzidas por microorganismos, os quais são universalmente aplicáveis (SWAMINATHAN, B. & MATAR, G.M., 1993). Estes métodos podem ser categorizados em três amplos grupos, com base no tipo de macromoléculas alvo, as quais podem ser lipossacarídeos, proteínas ou ácidos nucléicos. Desde 1975, o desenvolvimento das técnicas de separação e amplificação dos ácidos nucléicos tem levado a aplicação dos métodos de

subtipagem baseadas nos ácidos nucleicos em diversos estudos epidemiológicos específicos. Tais métodos incluem a análise de *fingerprinting* baseado em sondas genéticas, a análise com enzimas de restrição de DNA genômico ou plasmidial (RFLP), e o *fingerprinting* baseado no PCR (através das técnicas de RAPD ou de PCR-RFLP) (SWAMINATHAN, B. & MATAR, G.M., 1993). As técnicas de RFLP e de PCR-RFLP serão abordadas mais detalhadamente nos itens 1.5.2.1 e 1.5.2.2.

Todos os métodos de sub-tipagem baseadas nas seqüências gênicas (com exceção do seqüenciamento de DNA) produzem como resultado, fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. Estes representam um *fingerprinting* da linhagem analisada, cujo perfil pode consistir de uns poucos (perfis plasmidiais, tipagem baseada em sondas, PFGE, PCR-RFLP e RAPD) ou inúmeras centenas de fragmentos de diferentes tamanhos (*fingerprinting* de DNA genômico). Os métodos de análise e interpretação destes dados dependem dos objetivos a serem alcançados pela subtipagem. Se o objetivo for comparar um número limitado de linhagens para determinar se uma linhagem é diferente de uma ou inúmeras outras, o simples exame visual dos dados é suficiente.

Os dados das análises de restrição podem ser adquiridos de inúmeras maneiras. Géis de agarose corados com brometo de etídio são usualmente fotografados e utilizados para as análises. Para a análise visual, o primeiro passo é determinar os tamanhos relativos de cada fragmento na linha, por comparação com um marcador de tamanho molecular aplicado no mesmo gel. A distância de migração, desde a origem, de cada fragmento do padrão bem como da amostra, são medidas por uma régua e registradas. O tamanho molecular estimado de cada fragmento é determinado por cálculos algorítmicos, pois a relação entre o tamanho e a mobilidade eletroforética dos fragmentos de DNA não é linear. Os dados podem também ser adquiridos e analisados por um *scanner* digital conectado a um computador com um programa apropriado (SWAMINATHAN, B. & MATAR, G.M., 1993).

1.5.2.1 Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP)

A análise de Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP) é baseada na utilização das chamadas enzimas de restrição ou endonucleases. Essas enzimas reconhecem seqüências específicas no DNA de 4 a 8 pares de base (pb), clivam a dupla fita nestes sítios específicos e conhecidos, e geram fragmentos de DNA com diferentes tamanhos moleculares, que podem ser facilmente observados após uma

eletroforese. Diferentes endonucleases geram diferentes fragmentos de restrição de uma mesma molécula de DNA (WATSON et al., 1992). As variações obtidas com os fragmentos gerados por uma endonuclease específica são chamadas RFLPs. Os RFLPs podem resultar de uma seqüência originada por rearranjos genéticos, da inserção ou deleção do DNA, ou ainda, da substituição de DNA, dentro do sítio de clivagem da endonuclease. Os dois primeiros tipos de fonte de variação são observados com todas as enzimas de restrição, enquanto que o terceiro tipo pode ser observado somente com a endonuclease cujo sítio de reconhecimento abrange o sítio de substituição.

A seleção das enzimas de restrição para uso na análise de RFLP é baseado em dois importantes critérios. Primeiro, os fragmentos de restrição precisam ser adequados em relação ao tamanho. Melhores resultados são obtidos com fragmentos de restrição de 1.000 a 15.000pb. Segundo, os fragmentos nesta faixa de tamanho não devem ser tão numerosos que produzam sobreposição de bandas as quais podem ocultar diferenças. Muitos investigadores selecionam a(s) melhor(es) enzima(s) por rastreamento empírico utilizando muitas enzimas em um conjunto de linhagens epidemiologicamente caracterizadas do microorganismo de interesse.

O isolamento e a purificação do DNA são passos críticos nas análises de RFLP, o DNA precisa estar suficientemente intacto e livre de impurezas que possam inibir as enzimas de restrição e levar às digestões parciais ou à ausência total de digestão. Ademais, a inibição pode ocorrer por metilação dos nucleotídeos dentro do sítio de reconhecimento da enzima, para a qual não existe solução. As vantagens das análises de restrição de DNA genômico é que elas são universalmente aplicáveis, são sensíveis, porque o genoma inteiro é avaliado por RFLP, e a técnica é de realização relativamente fácil (SWAMINATHAN, B. & MATAR, G.M., 1993).

1.5.2.2 RFLP de produtos amplificados por PCR (PCR-RFLP)

O PCR oferece inúmeras vantagens sobre os outros métodos de subtipagem: a velocidade, a necessidade de poucas células de microorganismos e um protocolo simplificado. Os métodos de subtipagem baseada em PCR podem ser categorizados em dois tipos. O primeiro é o chamado PCR-RFLP que envolve a amplificação de uma seqüência conhecida, a digestão com enzimas de restrição, e a comparação dos fragmentos de restrição do DNA amplificado de diferentes linhagens. O segundo é denominado RAPD, o

qual envolve segmentos amplificados randomicamente de um DNA alvo pelo uso de único iniciador que não tenha qualquer homologia específica com a seqüência alvo.

O PCR-RFLP é mais vantajoso do que as análises de restrição de DNA convencionais. As diferenças genéticas são determinadas por amplificação por PCR de uma seqüência alvo, seguido da digestão do segmento amplificado com uma ou mais endonucleases. Não há a necessidade da realização da hibridização molecular ou *Southern blotting* ou com a utilização de sondas. Outra vantagem do PCR-RFLP sobre a restrição do DNA genômico é que os produtos amplificados por PCR não são susceptíveis à metilação (SWAMINATHAN, B. & MATAR, G.M., 1993).

Em estudos prévios (GOUVEA et al., 1993; VONSOVER et al., 1993), a análise de PCR-RFLP foi utilizada para comparação rápida de uma grande quantidade de rotavírus isolados, e foi estabelecida uma relação entre alguns sítios no gene da proteína VP7 e o sorotipo (G tipo) ou a origem dos vírus, se humano ou animal. Em outros estudos (DUBOIS et al., 1997) a identidade entre os perfis de RFLP foram utilizados para estabelecer uma correlação entre contaminação em amostras de água e as sequências obtidas de amostras clínicas. Ainda, genes de virulência em microorganismos e operons ribossomais têm sido alvos para subtipagem por PCR-RFLP (SWAMINATHAN, B. & MATAR, G.M., 1993). Esta técnica pode, assim, ser utilizada para detectar diferenças genômicas num mesmo sorogrupo de rotavírus, evidenciando desta forma, diferentes linhagens destes vírus.

2. RELEVÂNCIA DO PRESENTE TRABALHO

Visto que, a incidência de diarreia causada rotavírus do grupo C, no Brasil, é obscura, e que, conhecer o impacto dessa doença é essencial para que medidas profiláticas possam ser adotadas e programas de vacinas avaliados, colaborações prévias produtivas entre o Instituto Evandro Chagas (Belém/PA) e o Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC (que realizaram estudos de sorotipagens (G) e genotipagens (P) de rotavírus do grupo A em crianças de Belém [MASCARENHAS et al., 1998 e 1999]), geraram interesse de ambos grupos de pesquisa, em realizar um estudo de epidemiologia molecular relacionado ao rotavírus do grupo C. Embora os dados epidemiológicos disponíveis para a realização do presente trabalho fossem limitados, permitindo apenas uma análise do período da patogênese da história natural dos rotavírus do grupo C na região suburbana de Belém do Pará, parece claro a importância de se tomar conhecimento da verdadeira taxa de incidência destes vírus e de sua distribuição e virulência, através da utilização de métodos diagnósticos com sensibilidade e especificidade adequadas para a detecção de tais agentes virais em amostras clínicas de crianças brasileiras, a fim de que as conclusões aqui apresentadas possam servir como um instrumento adicional na complexa rede dos estudos epidemiológicos.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar o período patogênico da história natural das infecções causadas pelo rotavírus do grupo C na comunidade, que não hospitalar, da região de Belém-do-Pará, utilizando as técnicas de RT-PCR e PCR-RFLP.

3.2. Objetivos Específicos

- Aplicar a metodologia de RT-PCR para detecção de rotavírus do grupo C em amostras de fezes de crianças de Belém-do-Pará.
- Comparar os resultados obtidos pelo método do RT-PCR com os resultados previamente obtidos por ELISA para o diagnóstico de infecção pelo rotavírus do grupo C.
- Aplicar a técnica de PCR-RFLP para evidenciar diferenças genômicas entre as linhagens virais presentes nas infecções de um grupo de crianças de uma mesma localização geográfica, em um determinado período de tempo (1983 a 1986).
- Caracterizar o perfil de excreção do rotavírus do grupo C nas amostras clínicas de uma mesma criança, coletadas periodicamente desde o seu nascimento até os três anos de idade, procurando determinar o perfil de excreção do vírus e o comportamento do hospedeiro ante a ocorrência de reinfecções.
- Organizar os dados de incidência do rotavírus do grupo C nas amostras de fezes e comparar os resultados com a história clínica dos pacientes sintomáticos da comunidade (não hospitalizados), cujos dados foram obtidos nas investigações realizadas através de um estudo longitudinal prospectivo promovido pelo Instituto Evandro Chagas, em Belém-do-Pará; caracterizando o período patogênico da História Natural das infecções causadas pelo rotavírus do grupo C.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

Belém do Pará está localizada ao leste da Amazônia junto a confluência de dois rios: Guamá e Pará. O clima é de floresta tropical chuvoso, com chuvas fortes durante os meses de fevereiro, março e abril. A média de temperatura anual fica entre 24 a 28°C e a umidade relativa do ar é regular e sempre alta em torno de 80% o ano todo (LINHARES et al., 1989).

As amostras utilizadas neste trabalho são provenientes de moradores da região suburbana de Belém (Figura 4).



Figura 4 - Aspecto de um dos bairros (Guamá) da cidade de Belém, onde o estudo foi realizado.
Nota: A foto foi gentilmente cedida por Yvone Gabbay, IEC.

4.2. Pacientes e amostras

As amostras de fezes utilizadas neste trabalho representam um subgrupo do total de amostras coletadas durante a vigência de um estudo longitudinal prospectivo que foi realizado durante os anos de 1983 a 1986, coordenado por pesquisadores do Instituto Evandro Chagas (FUNASA - Fundação Nacional de Saúde), localizado na capital do Pará, Belém. Embora não seja o objetivo do presente trabalho analisar ou discutir o total de resultados que foram obtidos com o conjunto global das amostras e análises, uma descrição do projeto inicial para a realização do estudo longitudinal será útil para a melhor compreensão da origem, relevância e seleção das amostras analisadas neste trabalho (Figura 5).

O estudo longitudinal iniciou com a seleção de gestantes, do sexto ao nono mês de gravidez, em outubro de 1982. A princípio foram selecionadas 217 gestantes, mas só participaram efetivamente do programa 88 mães. Os partos ocorreram no hospital público Santa Casa, entre o final de novembro de 1982 até final de março de 1983. Como 6 crianças morreram e 11 mudaram-se de Belém, apenas 71 crianças foram regularmente acompanhadas até o final do estudo, em março de 1986. Durante a permanência dos bebês no hospital, uma amostra de fezes era coletada diariamente de cada criança. Quando os mesmos foram para casa, as amostras eram coletadas em dias alternados até o 14º dia, depois disto, as amostras eram obtidas quinzenalmente e também nos dias em que os sinais de diarreia estivessem presentes. Eram considerados episódios de diarreia, quando as fezes fossem líquidas ou semi-sólidas e ocorresse mais do que 3 evacuações por dia. Neste caso, ou a mãe da criança levava-a até o IEC, onde a mesma era examinada por um médico, ou a equipe do IEC era avisado por telefone da ocorrência da diarreia e algum membro da equipe dirigia-se até a residência da criança; em ambos os casos, eram preenchidos prontuários médicos.

Entre outras análises, foram realizados testes de ELISA para a detecção de rotavírus do grupo A nas amostras coletadas. Os resultados assim obtidos foram publicados por ocasião do término do estudo (LINHARES et al., 1989). Das amostras que apresentaram resultados negativos para rotavírus do grupo A, foram escolhidas aleatoriamente 357 amostras referentes a 37 crianças para serem testadas para rotavírus do grupo C pelo método de ELISA sanduíche utilizando soro hiperimune de porcos infectados com o rotavírus do grupo C da linhagem Cowden, uma linhagem porcina. Estes testes foram realizados no CDC, em Atlanta, EUA.

Com a finalidade de confirmação dos resultados obtidos, 83 amostras (72 positivas e 11 negativas por ELISA) referentes a 30 crianças foram posteriormente enviadas ao Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da UFSC.

Além destas amostras, outras 70 amostras provenientes de uma única criança, escolhida ao acaso, as quais não foram testadas por ELISA, foram também enviadas ao LVA para análise por RT-PCR para rotavírus do grupo C. Assim, o total de amostras processadas para o atual trabalho foi de 153 amostras de 30 crianças (Figura 5).

Do grupo de 83 amostras, com as quais foram realizados testes de ELISA, 28 eram diarréicas e 55 eram assintomáticas (amostras controle). Somente as amostras diarréicas possuem prontuários médicos, os quais estavam armazenados no Hospital Santa Casa de Belém.

A criança, cujas 70 amostras sem resultado de ELISA foram analisadas por RT-PCR, tem a identificação No. 24006. Destas amostras, 4 eram diarréicas, mas somente para uma delas foi preenchido prontuário médico. O mesmo paciente possui outras 6 amostras (5 diarréicas e 1 assintomática), que foram incluídas no grupo amostral para o qual foram realizados testes de ELISA. O número total de amostras desta criança é, portanto, de 76 amostras, distribuídas conforme Tabela 2.

TABELA 2: Distribuição das amostras diarréicas e assintomáticas da criança N° 24006, de acordo com a presença ou ausência de resultados de ELISA para rotavírus do grupo C e de prontuários médicos disponíveis.

Amostras pcte. 24006	Analisadas por ELISA e com prontuário médico	Analisadas por ELISA e sem prontuário médico	Sem resultado de ELISA e com prontuário médico	Sem resultado de ELISA e sem prontuário médico
Diarréicas	5	0	1	3
Assintomáticas	0	1	0	66
Total	5	1	1	69

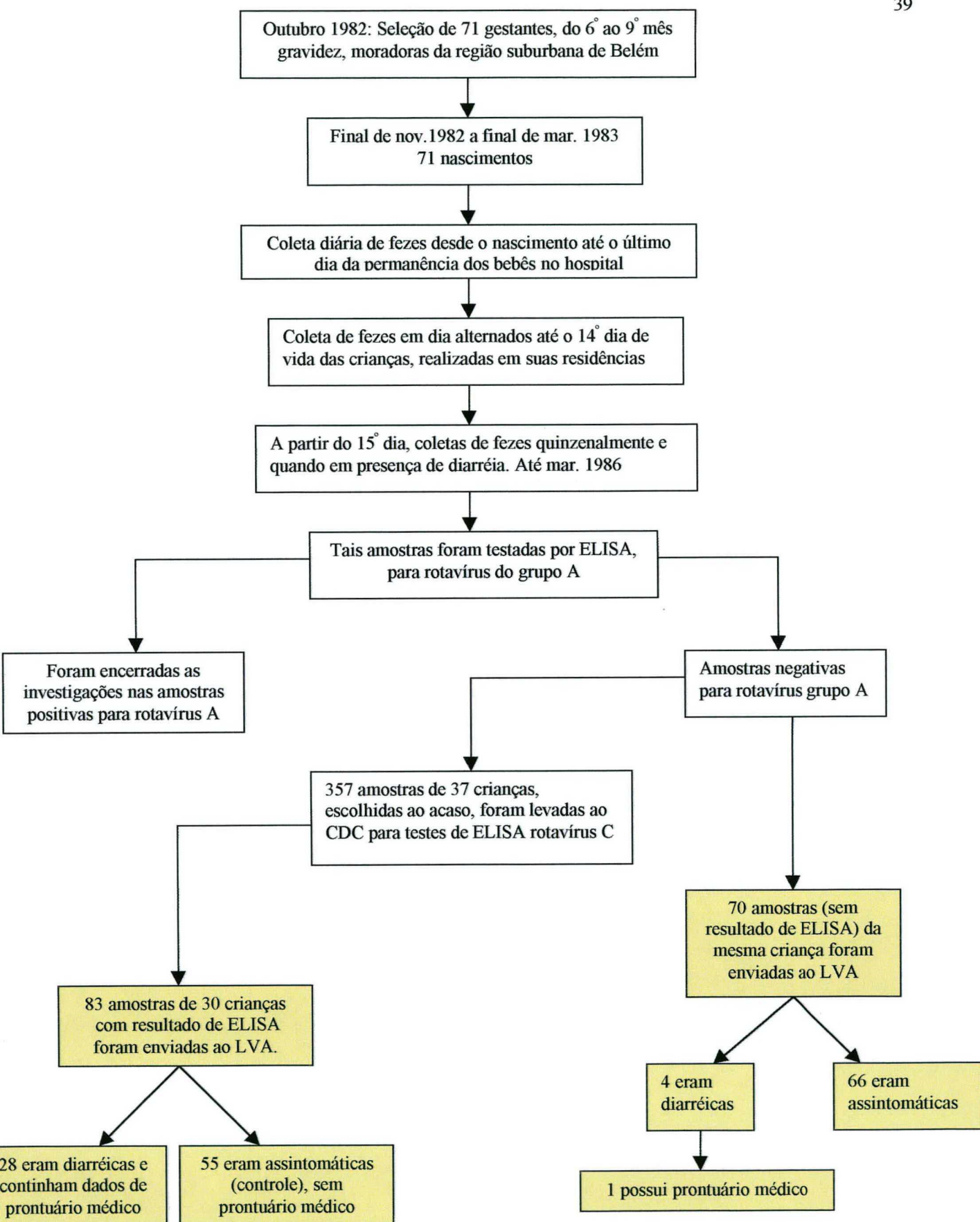


Figura 5: Fluxograma representando a seqüência de eventos que originaram as amostras utilizadas para a detecção de rotavírus do grupo C por RT-PCR, realizado no LVA, da Universidade Federal de Santa Catarina. Os quadros que citam as amostras estão em amarelo.

4.3. Ensaio imuno-enzimático tipo sanduíche para detectar antígeno de grupo (VP6) dos rotavírus do grupo C

Este ensaio foi realizado no CDC, em Atlanta, EUA, anteriormente ao presente trabalho; contudo, como os resultados daquele foram comparados com os aqui obtidos, o método será descrito conforme consta na literatura (TSUNEMITSU et al., 1992b; GABBAY et al; 1999).

As amostras de fezes foram diluídas preparando-se uma suspensão de 10%-20% em tampão-salina-fosfato e centrifugadas a 3.000x g por 15 min. a 4°C. Os sobrenadantes foram testados para detecção de antígeno de grupo do rotavírus C (VP6). Microplacas foram recobertas por 14 a 16h a 4°C com 100µL (por poço) com uma diluição de 1:3000 de anti-soro hiperimune ou um soro pré-imune gnotobiotico diluído em tampão bicarbonato (pH 9,6). As placas foram lavadas com PBS contendo 0,1% de Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com 2% BSA por 1 hora. Após a lavagem com PBS-T, 100µL dos sobrenadantes da suspensões de fezes foram adicionados à placa e esta incubada a 37°C por 2 horas. IgG biotinizada na concentração de 1µg/mL em 0,1M de tampão bicarbonato (pH 8,2) contendo 0,01 M NaCl e 0,002M de KCl foi adicionado em cada poço da placa lavada. A placa foi levada a incubação por 1 hora a 37°C. Após lavagem com PBS-T foi adicionado 100µL, por poço, de streptavidina conjugado à peroxidase a diluída 1:4000 em PBS. As placas foram incubadas a T.A. por 30min. e lavadas com PBS-T. Foi adicionado 200µL por poço do substrato 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benthizoline-6-sulfonato) e 0,045% de H₂O₂ em 0,1M de tampão citrato de sódio (pH 4,2) e as placas foram deixadas a T.A. por 30min. A reação foi interrompida por adição de 5% de SDS. As leituras foram realizadas em leitor de placa de ELISA A_{414 nm}. Os resultados foram expressos como a razão(P/N) de A_{414nm} no poço recoberto com anti-soro hiperimune (U339) por A₄₁₄ no poço recoberto com soro pré-imune. As amostras foram consideradas positivas quando a razão P/N foi maior ou igual a 2, e quando o valor P - N, foi maior ou igual a 1,7. Estes limites foram determinados pela média obtida com fezes negativas para rotavírus do grupo C mais 3 desvios padrão.

4.4. Produção de fluido infeccioso do rotavírus grupo C (RVC) (estoque viral)

Foram produzidos sobrenadantes infecciosos do RVC porcino, linhagem Cowden (linhagem de referência), para a sua utilização como controle positivo das reações de RT-PCR. Células MA-104, que são fibroblastos obtidos de rins embrionários do macaco *Rhesus sp* e que são permissivas à infecção *in vitro* pelos rotavírus (FRESHNEY, 1999) foram previamente cultivadas em garrafas de 25 cm² ou 75 cm² contendo Meio Mínimo Essencial com sais de Earle's (MEM, Sigma™) suplementado com soro fetal bovino (SFB, GibcoBRL®), antibióticos e antifúngico (GibcoBRL®). As garrafas foram mantidas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ até que se formasse uma monocamada confluyente de células.

O meio contido na garrafa foi descartado, e o tapete celular foi lavado 2x com tampão salina fosfato (PBS) (NaCl 150mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; Na₂HPO₄ 20mM e KCl 27mM pH 7.2). Um mL de fluido viral pré-existente (não quantificado), descongelado previamente, foi filtrado e adicionado às células. A garrafa foi incubada durante 1 hora a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, para propiciar a adsorção das partículas virais às células. A seguir, o inóculo foi removido e as células suplementadas com meio para infecção (meio MEM sem SFB e acrescido de 10µg/ mL de tripsina) e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ até a observação, ao microscópio invertido (Coleman XDP-1), do efeito citopático (ECP) nas células infectadas, o qual foi monitorado a cada 24h. Quando o percentual de destruição da monocamada atingiu 100%, as células foram congeladas a -80°C e degeladas a 37°C por 3x, com a finalidade de romper as membranas celulares. O fluido foi então congelado a -80°C para posteriores passagens virais, o que levou ao aumento do título viral.

Para realizar a passagem subsequente o fluido foi descongelado e centrifugado a 4°C, 350xg por 20 min. O procedimento de infecção de uma nova garrafa de células foi realizado conforme descrito anteriormente. Este procedimento foi repetido até que o fluido apresentasse um título viral suficiente para produzir ECP em 100% das células no tempo normal de um ciclo de replicação do rotavírus, que oscila entre 8,5 e 15 horas (ESTES et al., 1979). Neste trabalho considerou-se o tempo máximo de 15 horas. Para os fins a que este fluido destinou-se, não houve necessidade de titulação do fluido viral. A cultura final foi então congelada a -80°C e degelada a 37°C por 3x, centrifugado a 350xg, 4°C, por 20 min e dividido em alíquotas de 0,5 mL que foram estocadas a -80°C.

4.5 Preparo das suspensões de fezes

As amostras de fezes foram enviadas ao LVA em gelo seco e estocadas a -80°C . De cada amostra foram preparados 1 ml de suspensões fecais a 10% em tampão salina fosfato (PBS). As suspensões foram distribuídas em dois tubos (com 0.5mL de suspensão) para cada amostra, um para análise e outro para contra-prova. As mesmas foram, então estocadas a -80°C .

4.6 Isolamento do RNA viral a partir das suspensões de fezes

4.6.1 Extração com fenol-clorofórmio

Os RNAs virais foram extraídos de acordo com metodologia proposta por SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS (1989), previamente padronizada no LVA, com pequenas modificações: 500 μl de suspensão de fezes foram extraídos com igual volume de triclorotrifluoretano (Freon 113). A minicentrífuga Eppendorf refrigerada a 4°C foi utilizada em todos os procedimentos envolvendo a manipulação do RNA e os ensaios de RT-PCR. As amostras foram vigorosamente homogeneizadas com auxílio de um aparelho Vortex e centrifugadas a 10.000rpm por 5 min. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para outro tubo e foram adicionados 50 μl de uma solução de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% na concentração final de 1%, e procedeu-se incubação em BM (banho-maria) a 37°C por 30min. As amostras foram então desproteinizadas com 500 μl de uma mistura de fenol (saturado em tampão Tris-HCl pH 8,0) e clorofórmio, na proporção 1: 1. As amostras foram vigorosamente homogeneizadas no Vortex e centrifugadas a 10.000rpm por 5 min. Novamente, a fase aquosa foi transferida para outro tubo limpo, acrescentada de 500 μl de clorofórmio para remover traços de fenol, e o processo de extração foi repetido. O RNA obtido na fase aquosa foi precipitado em presença de 50 μl de solução aquosa de acetato de sódio 3 M pH 5,2 (0,3 M - concentração final) e de 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. Os RNAs foram então estocados a -20°C .

4.6.2 Extração com Trizol™

Os tubos contendo o RNA precipitado em etanol foram centrifugados a 12.000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi desprezado por inversão e o sedimento formado no fundo do tubo foi seco ao ar por 10 a 15min. O sedimento de RNA foi ressuspensão em 100 µl de água MilliQ autoclavada. Em seguida, 300µl de Trizol™ (solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato) foi adicionado em cada tubo. Incubou-se por 5min à temperatura ambiente (T.A.), segundo especificações do fabricante. Foram adicionados 80 µl de clorofórmio e agitou-se vigorosamente, manualmente, por 15 s. Incubou-se 10 min. em T.A. Os tubos foram, então, centrifugados a 12.000 por 15min. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para outro tubo e foram adicionados 200µl de isopropanol. Os tubos foram agitados manualmente por 15s e incubados por 10min em T.A.. Centrifugou-se a 8.000 rpm por 10min, o sobrenadante foi desprezado por inversão, e adicionou-se 400 µl de etanol a 70% gelado. Nesta etapa, os RNAs poderiam ser armazenados a -20°C para posterior processamento ou poderiam ser já preparados para a reação de transcrição-reversa, como a seguir:

Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 20min. Os sedimentos foram ressuspensos em 50 µl de água MilliQ autoclavada.

O fluido viral de RVC cepa Cowden, utilizado como controle positivo, foi extraído apenas com Trizol™, utilizando-se o mesmo protocolo das amostras clínicas. Porém, o RNA do RVC Cowden, uma vez ressuspensão em água, foi dividido em alíquotas de 5 µl, prontas para uso posterior nas reações de transcrição-reversa.

4.7 Ensaios de RT-PCR e *nested* PCR

Os protocolos utilizados, com ligeiras modificações, bem como, os pares de iniciadores que foram utilizados nas reações, foram anteriormente descritos por RIEPENHOFF-TALTY *et al.* (1996). Estes foram escolhidos por serem análogos à seqüência de regiões conservadas do gene 5 do RVC, que é comum às linhagens porcina e humana. As seqüências destes iniciadores encontram-se na tabela 3.

Tabela 3: Seqüência dos iniciadores utilizados para a amplificação do gene 5 do RVC através da reação de RT-PCR.

Iniciador	Seqüência (5'-3')
C1 (<i>sense</i> , externo)	CTCGATGCTACTACAGAATCAG
C4 (<i>anti-sense</i> , externo)	GCCACATAGTTCACATTTTCATCC
C2 (<i>sense</i> , interno)	GCTAACTGGAGAAGAGACTCAG
C3 (<i>anti-sense</i> , interno)	GGGATCATCCACGTCATGCG

NOTA: *sense*: sentido 5'→3'; *anti-sense*: sentido 3'→5'

Os iniciadores externos, foram utilizados nas reações de RT e de 1° PCR. Estes flanqueiam uma região no gene 5 de 358 pb. Os iniciadores internos, utilizados na reação de *nested* PCR, flanqueiam uma região interna do segmento anterior, cujo tamanho é de 267pb.

Os controles de reação utilizados foram: RNA extraído de fluido infeccioso Cowden, como controle positivo; e água, como controle negativo dos reagentes. Ambos os controles eram tratados exatamente da mesma maneira que as amostras, e foram incluídos em todas as baterias (um grupo de amostras processadas em conjunto) de realização das reações de RT e PCR (1° e 2°).

4.7.1 Transcrição- reversa (RT) das amostras de RNA viral

Para o preparo das reações, os reagentes foram manipulados num ambiente físico diferente daquele de adição do RNA. A mistura de reação era preparada com os componentes listados na Tabela 4. Foram adicionados todos os reagentes e imediatamente após a adição da enzima Transcriptase reversa, a mistura de reação foi deixada em gelo até sua utilização, logo a seguir.

Numa outra sala, 5,0 µl de RNA viral dupla fita purificado e solubilizado em água era desnaturado a 99°C em presença de 40% de dimetilsulfóxido (DMSO) num termociclador (PTC-200 Peltier Thermal Cycler™ ou MiniCycler™, MJ Research) , então, imediatamente transferido para o gelo. A mistura de reação previamente preparada foi adicionada sobre o RNA desnaturado. Os tubos foram então homogeneizados, centrifugados rapidamente, e recolocados no termociclador a 37° C por 1 hora.

Tabela 4: Reagentes e concentrações requeridos para reação de RT

Reagentes	Concentração final
5 X Tampão de RT, com 15 mM de Mg ⁺²	1 x Tampão, 3 mM de Mg ⁺²
DTT (Dititreitol) 0.1 M	5 mM
dNTPs 10 mM	200 µM
Iniciador C1	104 pmol/µl
Iniciador C4	89 pmol/ µl
Agua Mili Q	q.s.p 30 µl
M-MLV Reverse Transcriptase (GibcoBRL®)	40 U
Volume total	30 µl

4.7.2 Primeira reação de PCR

Cinco microlitros do produto da transcrição reversa (cDNA) foi utilizado para o 1° PCR, o qual foi realizado de duas maneiras: ou utilizando os reagentes mostrados na tabela 5, ou utilizando uma mistura de reagentes pronta para uso, a PCR SuperMix™ (GibcoBRL®), a qual se apresenta em frascos contendo volume suficiente para 100 reações, os quais devem ser aliquotados tão logo sejam abertos, em alíquotas de 45µl sobre as quais, são adicionados os iniciadores somente no momento do uso. O protocolo de amplificação foi o mesmo para ambas as maneiras: 30 ciclos de 94°C por 1 min, 45°C por 2 min e 72°C por 1 min com extensão final de 72°C por 10 min.

4.7.3 Reação de *nested* PCR

Dois microlitros do produto do 1° PCR, foram utilizados para o *nested* PCR. Estas reações foram realizadas à semelhança da anterior, com uma única diferença: os iniciadores utilizados foram o C2 e o C3, nas respectivas concentrações finais 106 e 76.4 pmol/ µl. O protocolo de amplificação utilizado foi também o mesmo que o anterior.

Tabela 5: Reagentes e concentrações requeridos para reação de 1° PCR

Reagentes	Concentração final
Tampão de Taq pol. 10x conc. sem Mg	1 x
dNTPs 10 mM	0.2 mM
MgCl ₂ 50 mM	1.5 mM
C1	104 pmol/ µl
C4	89 pmol/ µl
Taq Polymerase (GibcoBRL®)	2.5 U
Água MilliQ	q.s.p. 45,0µl
Volume final	45,0µl

4.7.4 Análise dos produtos de PCR por eletroforese em géis de agarose ou de poliacrilamida

Os produtos de amplificação gênica do *nested* PCR foram analisados em géis de agarose a 1,5 % ou de poliacrilamida a 10% (PAGE) (SAMBROOK et al., 1989).

Cinco microlitros de cada amostra foram misturados ao tampão de aplicação (azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40% p/v em água) e aplicados no gel. A eletroforese foi realizada a 104 V em tampão de corrida TBE - Tris/Borato/ EDTA (Tris-HCl 0,09M, ácido bórico 0,09M e EDTA 0,002M). Os marcadores de tamanho molecular utilizados, a cada conjunto de amostras, foram 100pb DNA *ladder* (GibcoBRL®) ou 123 pb DNA *ladder* (GibcoBRL®). Os géis foram corados com solução aquosa de brometo de etídeo a 0,5µg/ml, e os produtos amplificados foram visualizados através de exposição à luz UV em transiluminador e fotografados com câmara Polaroid. Alguns géis de PAGE foram corados também pelo nitrato de prata [127]. O tamanho molecular esperado foi de 267 pb.

4.8 Tratamento dos produtos do *nested* PCR com enzimas de restrição para análise de PCR-RFLP

Quatro enzimas de restrição AluI, BglII, MboI e XbaI (GibcoBRL®) foram utilizadas para digestão dos produtos do *nested* PCR. Estas enzimas foram escolhidas porque elas

produzem um padrão distinto de digestão do segmento de 267 pb do gene 5 do rotavírus do grupo C Cowden, conforme dados previamente publicados (RIEPENHOFF-TALTY *et al.*, 1996). Os sítios de reconhecimento das enzimas são mostrados na tabela 6.

As amostras a serem digeridas, necessariamente, deveriam ser positivas para rotavírus do grupo C, e o produto amplificado de 267 pb, observado após eletroforese, deveria ter apresentado uma banda de forte intensidade.

Para realizar as digestões, 8,0 µl do produto do 2º PCR das amostras, bem como do controle positivo Cowden, foi adicionado a 2,0 µl do tampão 10 x de cada enzima (concentração final 1 x), 9,0 µl de água MilliQ e 1,0 µl de enzima (10 U), seguindo as especificações do fabricante. A enzima Bgl II foi adicionada em dobro, 20 U. Os tubos foram incubados em B.M. a 37° C por 3 horas. Os produtos foram resolvidos por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, utilizando-se 8,0µl de amostras e 2,0 µl de tampão de aplicação. A eletroforese foi realizada a 104 V em tampão de corrida TBE - Tris/Borato/ EDTA (Tris-HCl 0,09M, ácido bórico 0.09M e EDTA 0,002M). Os marcadores de tamanho molecular utilizados foram 100pb pb DNA *ladder* (GibcoBRL®) ou 123 pb DNA *ladder* (GibcoBRL®).

Os géis foram corados com solução aquosa de brometo de etídeo a 0,5 µg/ml, e os produtos digeridos foram visualizados através de exposição à luz UV em transiluminador e fotografados com câmara Polaroid. O tamanho dos fragmentos foi determinado por sistema de foto-documentação e análise de eletroforese (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120) Kodak Digital Science™.

Os resultados obtidos nas amostras foram comparados com o padrão de restrição obtido para o controle positivo da linhagem porcina Cowden.

Tabela 6: Sequências de reconhecimento e clivagem das endonucleases AluI, BglII, MboI e XbaI

Enzima	Sequência de reconhecimento
AluI	5'- AG ↓ CT-3' 3'-TC ↑ GA-5'
BglII	5'- A ↓ GATCT-3' 3'-TCTAG ↑ A-5'
MboI	5'- ↓ GATC-3' 3'-CTAG ↑ -5'
XbaI	5'- T ↓ CTAGA-3' 3'-AGATC ↑ T-5'

Retirado do catálogo GIBCO BRL *products & reference guide* 2000/2001

4.9 Análise estatística

A associação entre a excreção dos rotavírus do grupo C e a ocorrência de diarreia (patogenicidade) foi avaliada pelo teste do Qui-quadrado (χ^2).

As associações independentes entre as variáveis de sintomatologia em estudo e a incidência de rotavírus foram estimadas. Para identificar os fatores associados com a doença por rotavírus do grupo C em crianças com diarreia (virulência) foram comparados os sintomas de crianças com episódios de diarreia com resultados positivos e com resultados negativos para rotavírus do grupo C por RT-PCR (gene 5). As comparações foram estatisticamente avaliadas pelo teste do χ^2 .

A comparação entre o número de amostras positivas para rotavírus do grupo C pelo método de ELISA e pelo método do RT-PCR foi também avaliada pelo teste χ^2 . O nível de significância estatística selecionado para todas as análises foi de 5 % ($\alpha=0,05$).

4.10 Cálculo do Coeficiente de ataque.

O coeficiente de incidência é definido como a razão entre o N° de casos novos de uma doença que ocorra em uma comunidade, em um intervalo de tempo determinado, e a população exposta ao risco de adquirir referida doença no mesmo período; multiplicando-se o resultado por potência de 10, que é a base referencial da população. Quando a taxa de incidência refere-se a uma população específica ou a um grupo bem definido de pessoas, limitadas a um período de tempo e localizadas em uma área restrita, esta passa a chamar-se coeficiente de ataque (ROUQUAYROL, 1992). Para calcular o coeficiente de ataque é necessário calcular o N° de pessoas por unidade de tempo de observação, chamado pessoas-ano, assim, uma pessoa que tenha sido seguida durante um ano é considerada como tendo contribuído com uma pessoa-ano de observação. Como 30 pessoas foram observadas durante 3 anos então equivalem a 90 pessoas-ano de observação. O cálculo do coeficiente de ataque pode ser feito de duas maneiras:

$$1) \text{ Coef. Ataque} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de eventos na população em estudo}}{\text{pessoa-unidade de tempo de observação}} \times 100$$

$$2) \text{ Coef. Ataque} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de pessoas afetadas na população em estudo}}{\text{pessoa-unidade de tempo de observação}} \times 100$$

No primeiro caso, são também contabilizadas as ocorrências que tenham atingido várias vezes a mesma pessoa, ou seja, as re-infecções. No segundo caso, ficam descartados os episódios de re-infecções. Neste trabalho adotou-se o segundo cálculo. Os coeficientes de ataque foram calculados para cada ano do estudo e o coeficiente de ataque cumulativo foi calculado utilizando-se as incidências dos três anos. A potência de dez referencial adotada foi de 10^2 para que os resultados pudessem ser expressos em percentagem.

Observação Importante: Como este trabalho envolve manipulação de amostras clínicas de pacientes, o mesmo deveria também ter sido encaminhado ao Comitê Interno de Bioética da UFSC. Devemos, entretanto, considerar as seguintes justificativas: 1) São amostras antigas (1983-1986) e estes pacientes não encontram-se mais acessíveis para o preenchimento dos formulários de consentimento; 2) Nesta época não haviam sido estabelecidas as normas de Bioética humana nos projetos de pesquisa.

5. RESULTADOS

5.1 Detecção de rotavírus do grupo C em amostras de fezes pelo método do RT-PCR

Após o duplo processo de extração dos RNAs virais em amostras de fezes e a etapa subsequente de transcrição-reversa aos DNAs complementares (cDNAs), estes serviram como moldes para as reações. O 1º PCR feito com os iniciadores específicos para o gene 5 do RVC, denominados C1/C4 (externos), produziu segmentos gênicos amplificados de 356pb, que somente foram visíveis nas reações feitas com o RNA do controle positivo Cowden. No *nested* PCR, os iniciadores internos C2/C3 permitiram uma produção satisfatória de cópias do segmento gênico interno de 267 pb, tanto do controle positivo quanto das amostras clínicas, que puderam ser visualizadas após eletroforese e coloração com brometo de etídeo (Fig 6).

Das 153 amostras analisadas (83 de 30 crianças, e 70 de uma mesma criança), 95 (62,1%) foram positivas e 58 (37,9%) foram negativas para o gene 5 do RVC, detectados pelo método do RT-PCR (Fig. 7). Das 95 amostras positivas, 18 (19%) eram diarréicas e 77 (81%) eram assintomáticas. Das 58 amostras negativas, 14 (24%) eram diarréicas e 44 (76%) eram assintomáticas. (Fig. 8). Uma das amostras analisadas (ID. Nº 24002-75) apresentou a amplificação de 3 bandas inespecíficas (479, 674 e 932pb) de intensidades muito mais fortes do que a banda de 267 pb (Fig. 9); esta amostra foi designada como "indeterminado", embora a mesma tenha sido computada como negativa para cálculos de porcentagens de amostras positivas e para cálculos de comparação de resultados entre ELISA e RT-PCR.

A análise estatística, feita pelo teste de associação do Qui-quadrado, mostrou que não há diferença significativa entre as amostras diarréicas positivas e diarréicas negativas para rotavírus do grupo C, ao nível de $\alpha = 0,05$. O valor obtido de $\chi^2 = 0,587$, é inferior ao valor crítico de 3,84.

Foram observados alguns casos de contaminação dos produtos de PCR durante a realização das reações de amplificação. Este fato originou a repetição de muitas baterias de amostras, e várias providências foram tomadas para eliminar tal problema (mais detalhes serão abordados no item Discussão). A comparação dos produtos do *nested* PCR das mesmas amostras clínicas, processadas em dois momentos distintos, pode ser visualizado na figura 10 em bateria inválida (A), devido ao resultado positivo do controle negativo (linha

12) e, em bateria com resultados definitivos (B), devido ao resultado negativo, do controle negativo (linha 12).

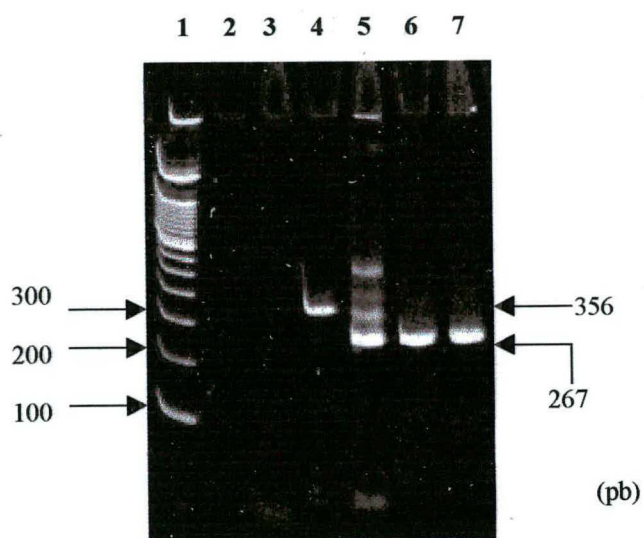


Figura 6: Produtos de amplificação de 1^o PCR e *nested* PCR, utilizando iniciadores específicos ao gene 5 do rotavírus do grupo C.
Linhas 1, 100 pb ladder; 2 e 3, 1^o PCR de amostras clínicas; 4, 1^o PCR do Cowden com; 5, *nested* PCR do Cowden; 6 e 7, *nested* PCR de amostras clínicas.

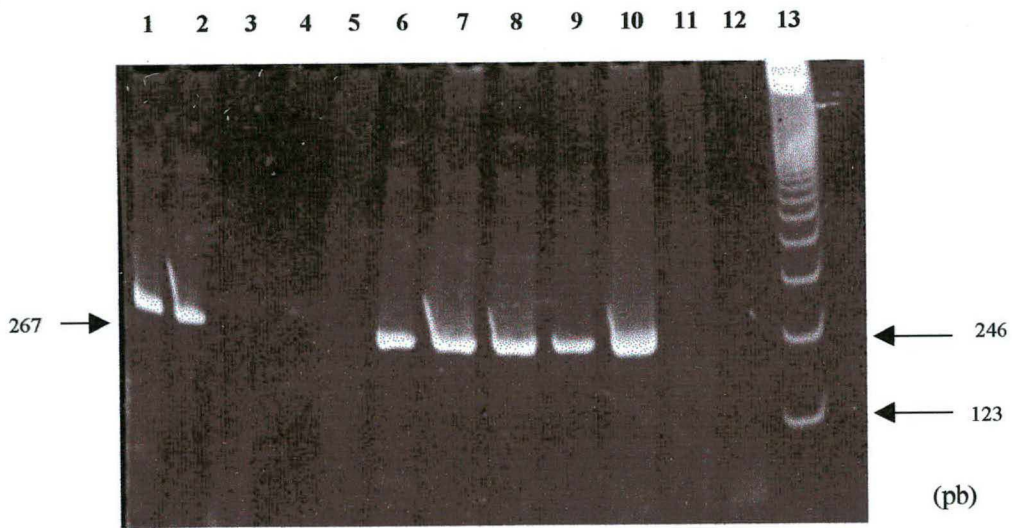


Figura 7: Produtos de amplificação, com 267pb, do *nested* PCR do gene 5 do rotavírus do grupo C, de amostras clínicas e controles. Linhas: 1, 2 e 6-9, amostras clínicas positivas; 3-5, amostras clínicas negativas; 10, controle positivo; 11, controle negativo; 13, 123 pb ladder

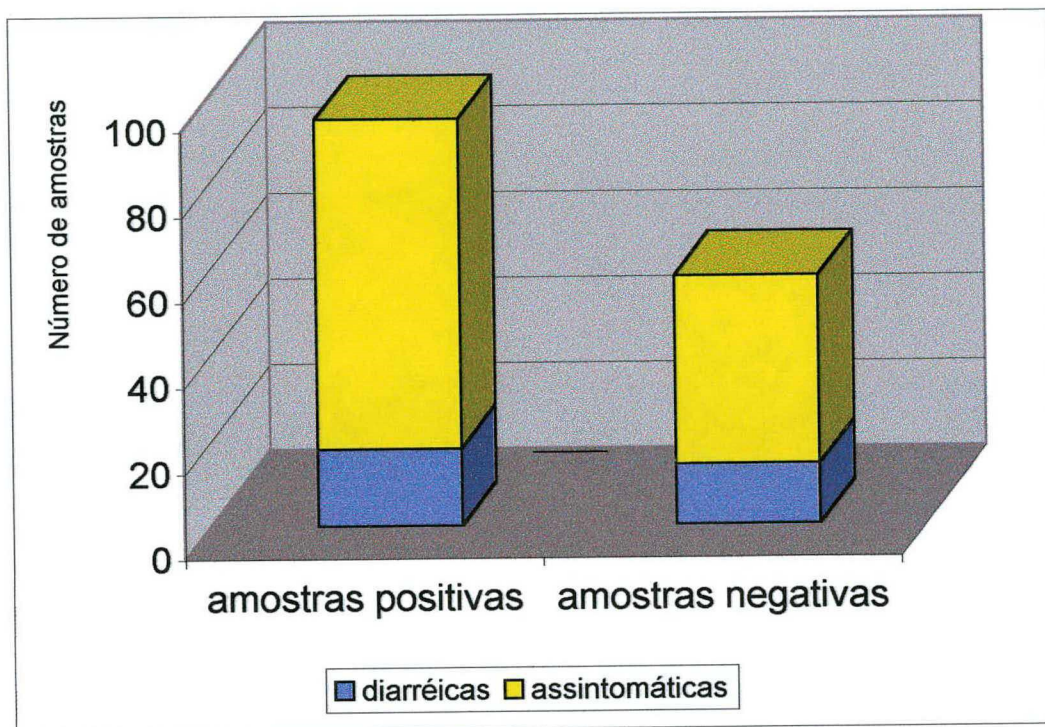


Figura 8: Distribuição de amostras diarréicas e assintomáticas (controle) de acordo com a presença de Rotavírus do grupo C (detectado por RT-PCR gene 5) em 153 amostras de fezes de 30 crianças de Belém-do-Pará, no período de março de 1983 a março de 1986.

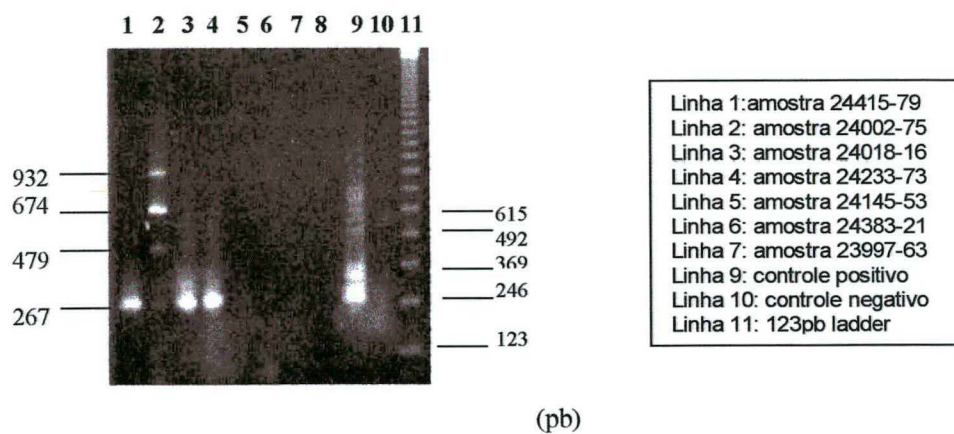


Figura 9: Visualização de uma amostra clínica apresentando a amplificação de 3 bandas inespecíficas de tamanhos 479, 674 e 932pb, e outras amostras apresentando bandas específicas de 267 pb.

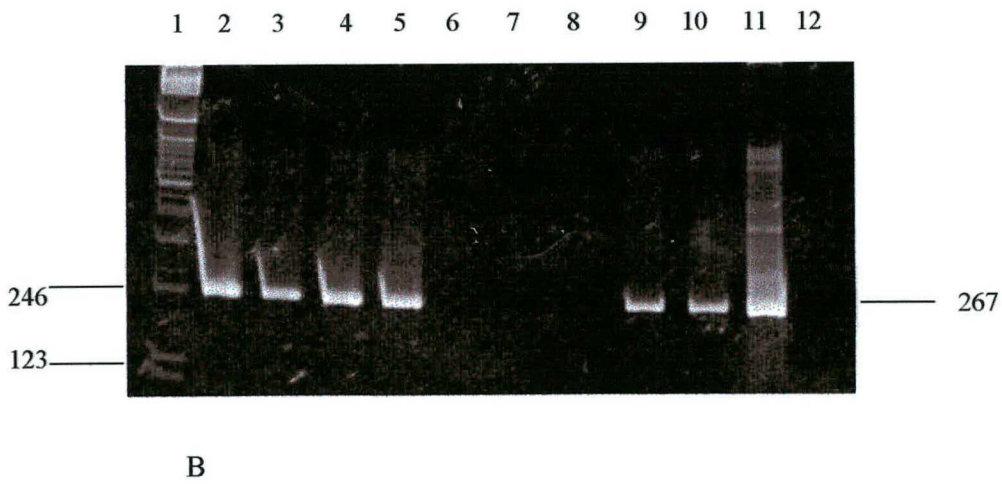


Figura 10 A e B: Comparação dos produtos do *nested* PCR das mesmas amostras clínicas: linhas 1-9 (A) e 2-10 (B); controle negativo linha 11 (A) e 12 (B) e, controle positivo, linha 10 (A) e 11 (B); 123 *ladder*, 12 (A) e 1 (B).

A distribuição anual das 83 amostras de fezes de 30 crianças, associada à positividade para o gene 5 do RVC e o número de crianças infectadas em Belém-do-Pará, de 1983 a 1986, pode ser visualizada na Tabela 7.

Tabela 7: Distribuição anual de amostras de fezes de 30 crianças, Nº de amostras positivas para o gene 5 do rotavírus do grupo C e Nº de crianças infectadas em Belém-do-Pará, de 1983 a 1986.

Ano	intervalo de idade (meses)	total de amostras	amostras* positivas	crianças** infectadas
1983	2 a 14	21	13 (61,9%)	10 (33%)
1984	12 a 26	40	29 (72,5%)	19 (63%)
1985	25 a 36	22	10 (45,5%)	09 (30%)

* Incluídas as reinfeções.

** Excluídas as reinfeções

O coeficiente de ataque (CA) de crianças infectadas por RVC foi de 5 %no ano de 1983; 9% no ano de 1984, e 4% no ano de 1985. O CA cumulativo de crianças infectadas por RVC ao final de três anos foi de 14%. Porém, o CA de crianças que desenvolveram diarreia por RVC em 1983 foi de 1,4%, em 1984 foi de 4,2% e em 1985 foi de 0,9%. O CA cumulativo de casos de diarreia por RVC ao final de três anos foi de 5%.

A associação da variável idade com a presença de RVC (detectado por RT-PCR, gene 5) foi analisada em 83 amostras de 30 crianças. As amostras com resultado positivo por RT-PCR foram divididas em grupos de faixa etária da seguinte forma: de 0 a 6, de 7 a 12, de 13 a 24 e de 25 a 36 meses de idade. As amostras ainda foram subdivididas em diarreicas e assintomáticas. O resultado desta análise pode ser visualizado na figura 11. Das 52 amostras positivas para RVC, três (6%) eram de crianças com menos de 7 meses, todas assintomáticas; oito (15%) eram de crianças entre 7 e 12 meses, destas, duas eram diarreicas; trinta (58%) eram de crianças entre 13 e 24 meses, 12 destas amostras eram diarreicas; e onze (21%) eram provenientes de crianças entre 25 e 36 meses, apenas duas eram diarreicas. A análise estatística, pelo teste do χ^2 , demonstrou que não houve diferença significativa entre as diferentes faixas etárias e a taxa de detecção dos rotavírus do grupo C.

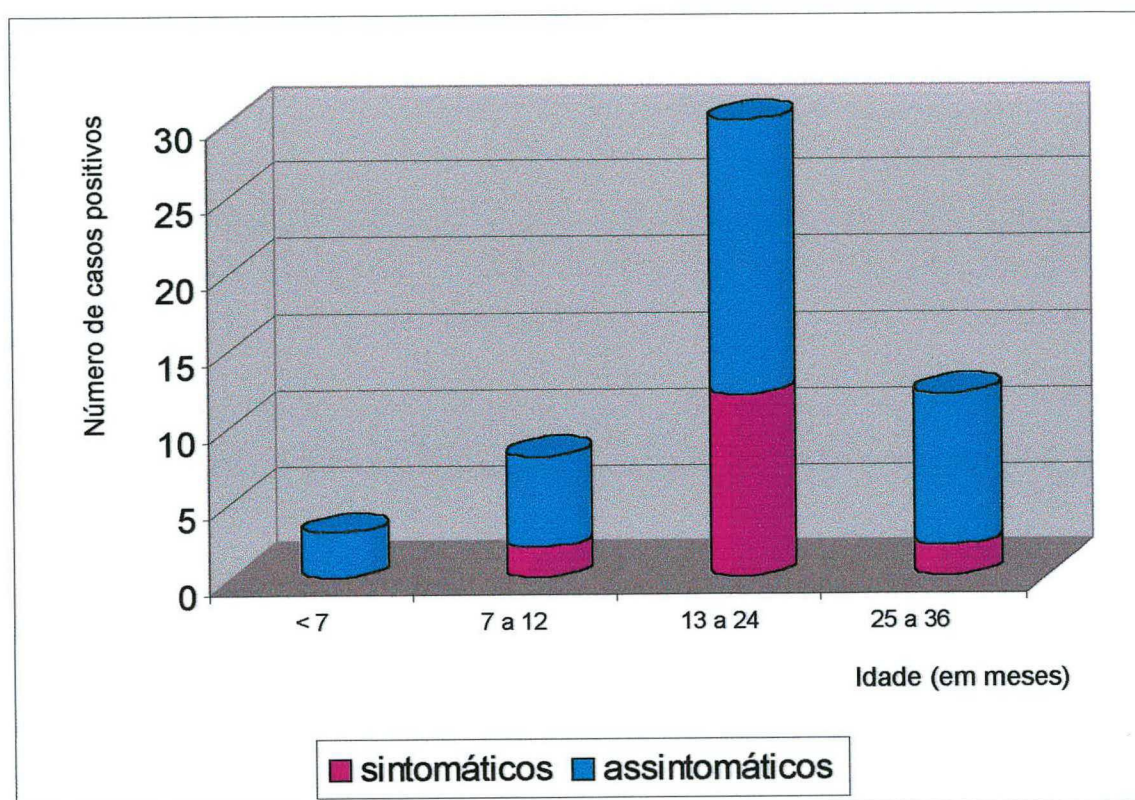


Figura 11: Frequência de casos positivos para rotavírus do grupo C (detectadas por RT-PCR gene 5) em 83 amostras de 30 crianças de Belém, distribuídas de acordo com a idade, de março de 1983 a março de 1986.

A sazonalidade do RVC na região de Belém do Pará foi analisada como a frequência mensal dos casos positivos por RT-PCR gene 5, em cada um dos anos de estudo. Esta distribuição pode ser visualizada nas figuras 12-15. Em todos os 12 meses que constituem um ano, foram detectados casos de infecção por RVC, com uma média de detecção anual de 1,4 casos/mês/ano. No ano de 1983 (considerado de 01/03/83 até 31/03/84), a média de detecção mensal foi de 1 caso/mês. No ano de 1984 (considerado de 01/04/85 até 31/03/86), a incidência de casos foi maior do que nos outros anos de estudo, especialmente nos meses de maio e outubro apresentando, respectivamente, 5 e 4 casos positivos. A média de detecção mensal, em 1984, de casos positivos foi de 2,4 casos/mês. No ano de 1985 (considerado de 01/04/85 até 31/03/86), a média de detecção mensal foi de 0,8 casos/mês. A média de detecção acumulada nos três foi de 4,3 casos/mês.

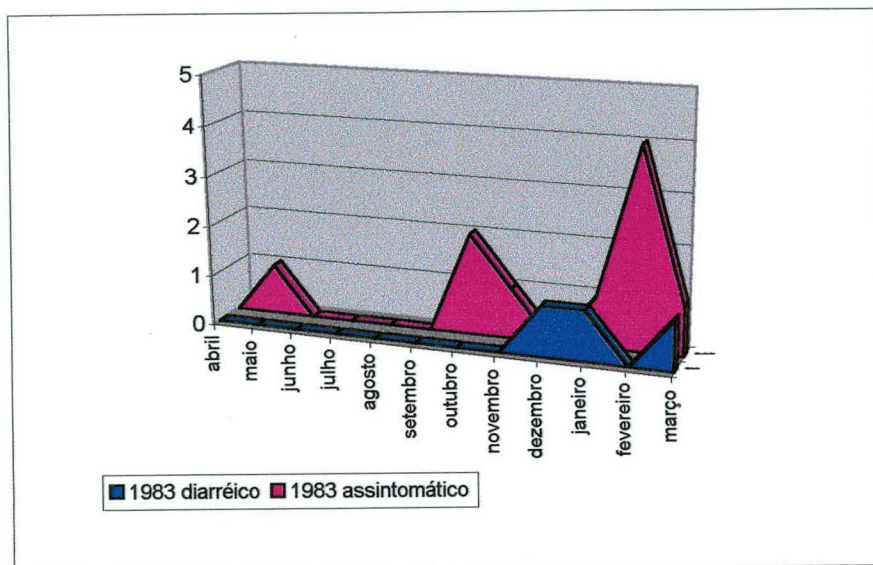


Figura 12: Frequência mensal dos casos positivos para Rotavírus do grupo C, detectados por RT-PCR gene 5, de 7 de março de 1983 a 31 de março de 1984, em 83 amostras de fezes de 30 crianças de Belém, PA.

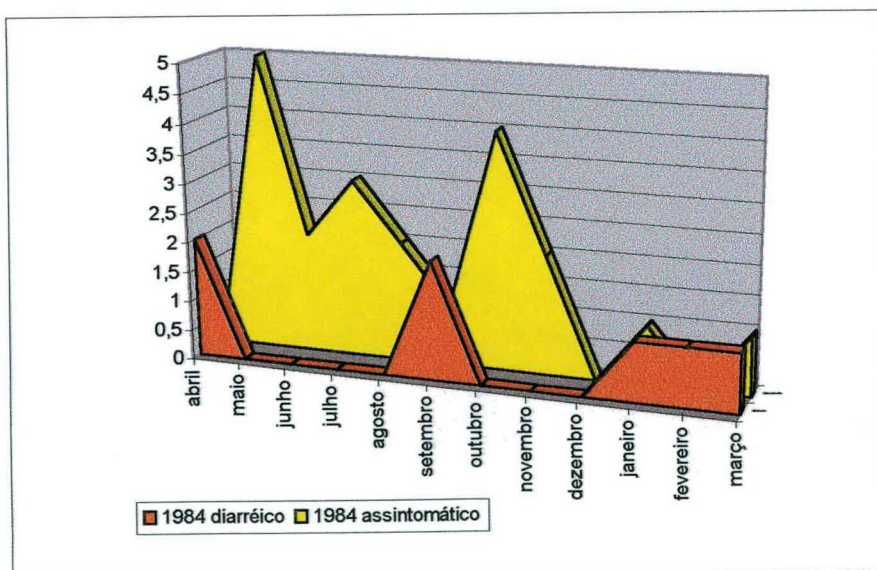


Figura 13: Frequência mensal dos casos positivos para Rotavírus do grupo C, detectados por RT-PCR gene 5, de abril de 1984 a março de 1985, em 83 amostras de fezes de 30 crianças de Belém, PA.

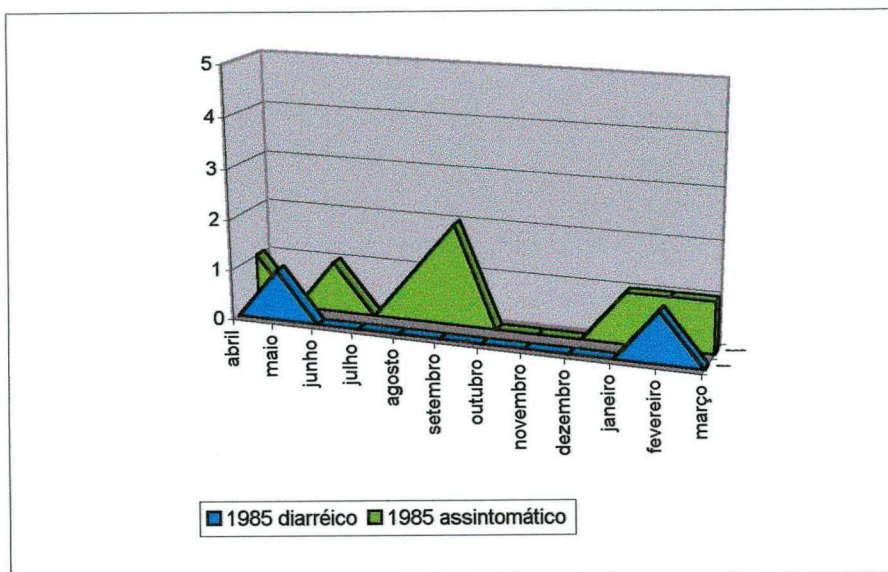


Figura 14: Frequência mensal dos casos positivos para Rotavírus do grupo C, detectados por RT-PCR gene 5, de abril de 1985 a março de 1986, em 83 amostras de fezes de 30 crianças de Belém, PA.

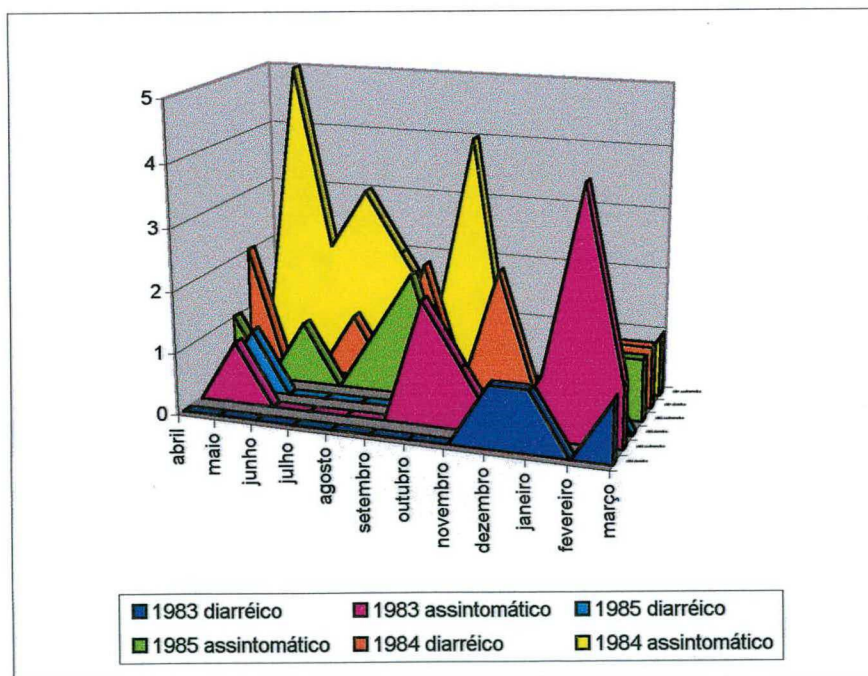


Figura 15 : Frequência mensal dos casos positivos para Rotavírus do grupo C, detectados por RT-PCR gene 5, de março de 1983 a março de 1986, em 83 amostras de fezes de 30 crianças de Belém, PA.

5.2 Comparação entre os métodos de ELISA de captura de antígeno VP6 da linhagem Cowden e RT-PCR para detecção do gene 5 do rotavírus do grupo C em amostras de fezes.

Oitenta e três amostras foram analisadas por ambos os métodos. O número de amostras positivas para RVC pelo método de ELISA foi de 72 (86,7%), enquanto que 11 amostras (13,5%) foram negativas. Pelo método do RT-PCR, 52 amostras (62,6%) foram positivas e 31 (37,3%) foram negativas. A análise estatística, feita pelo teste de associação do χ^2 , mostrou que não há diferença significativa entre a taxa de detecção de amostras positivas e negativas de ambos os métodos ao nível de $\alpha = 0,05$, o valor obtido de χ^2 foi 1,602, que é inferior ao valor crítico 3,84. A comparação entre os dois métodos pode ser visualizada na figura 16.

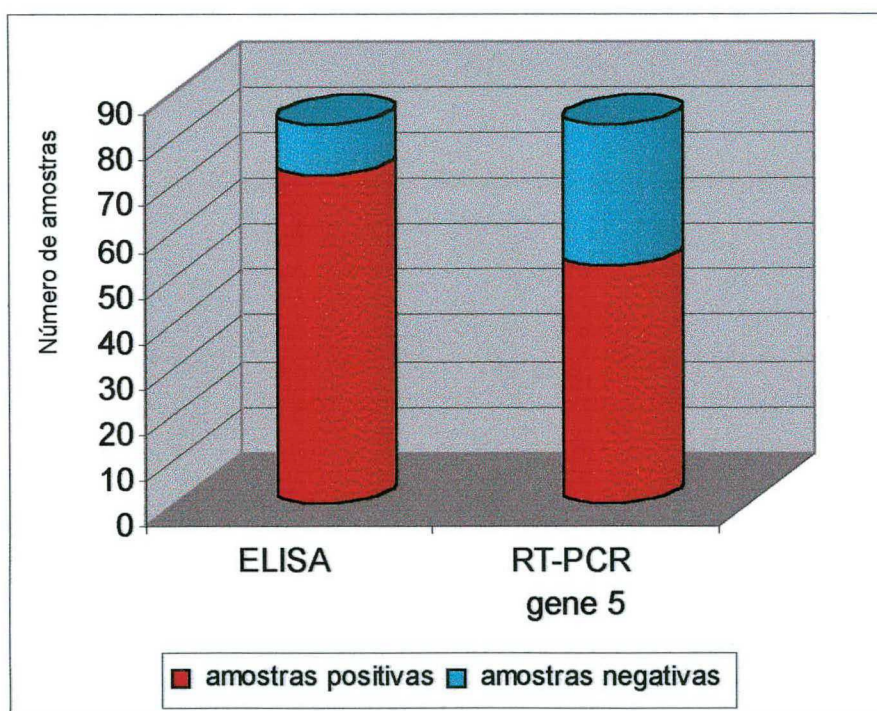


Figura 16: Comparação dos resultados obtidos pelos métodos de ELISA captura de antígeno VP6 e RT-PCR para gene 5 do rotavírus do grupo C, em 83 amostras de fezes diarreicas e assintomáticas de 30 crianças de Belém, PA de 1983 a 1986.

5.3 Correlação entre sintomas clínicos e a presença do rotavírus do grupo C detectado por RT-PCR (gene 5)

Em 29 amostras diarréicas, de 14 pacientes que possuíam prontuário médico, foram analisados os dados de sintomatologia, tais como: número de evacuações/dia, presença de náuseas, vômitos, febre, anorexia, dor abdominal, indisposição geral, sintomas respiratórios, outros patógenos enteréricos, e amamentação; além da presença de RVC detectado por RT-PCR (gene 5). A ocorrência global destas variáveis pode ser analisada na tabela 8. Nestas amostras, 17 casos foram positivos por RT-PCR para RVC, gene 5. As proporções de cada sintoma encontradas foram as seguintes (as porcentagens referem-se ao total de 29 amostras): náuseas e vômitos foram observados em 5 casos (17%), mas não nos outros 12 casos (41%); a febre estava presente em 10 dos episódios (35%) e ausente em 7 (24%); dor abdominal foi relatada em 7 casos (24%), porém 10 (35%) não a apresentaram; anorexia foi observada em 14 dos episódios (48%) e apenas 3 (10%) dos casos não a apresentaram; indisposição geral foi vista em 6 dos casos (21%) contra 11 (38%) sem este sintoma; e os sintomas respiratórios apareceram na metade dos casos (8 ou 28%). O número de evacuações/dia nestes casos variou de 3 a 7 com uma média de 4,3.

Proporções menores, porém semelhantes, foram encontradas nos 12 casos negativos por RT-PCR (gene 5) para RVC: náuseas foram relatadas em 3 casos (10%); vômitos em 4 (14%); febre em 5 (17%); dor abdominal em 8 (28%); anorexia em 9 (31%); indisposição em 1 (3%) e sintomas respiratórios em 6 (21%). O número de evacuações/dia nestes casos variou de 3 a 6 com uma média de 3,7. As análises estatísticas feitas com o teste do χ^2 mostraram que não há associação estatística significativa, ao nível de $\alpha = 0,05$, entre nenhum dos sintomas estudados e a presença do RVC detectados por RT-PCR (gene 5).

Foi também avaliado, a associação da amamentação com a presença de diarreia por RVC. Apenas 5 (17%) crianças estavam sendo amamentadas quando ocorreram os episódios de diarreia, destas 4 (14%) foram positivas para RVC. Entre as que não estavam sendo amamentadas, 12 (41%) foram positivas para rotavírus do grupo C e 11 (38%) foram negativas. Não foram, desta forma, encontradas associações significativas entre amamentação e presença de RVC.

TABELA 8: Sintomas clínicos, ocorrência de outros enteropatógenos e resultados do RT-PCR (gene 5) observados em 29 episódios de diarreia de 14 crianças sintomáticas de Belém-PA de 1983 a 1986.

paciente	n de episódios	ordem do episódio	evac./ dia	ID. amostra	idade (meses)	sexo	náusea	vômito	febre	dor abdominal	anorexia	amamen- tação	indisposi- ção geral	sintoma resp.	Qual	estado nutricional/ desidratação	RT-PCR gene 5	outros patógenos			
24018	1	quarto	3	57	24	M	não	não	sim	sim	não	não	ND	não	sim	tosse	desnutrido/normal	positivo	<i>A.lumbricoides</i> , <i>G.intestinalis</i> , <i>Entamoeba coli</i>		
		primeiro	6	35	13	M	sim	sim	sim	sim	não	sim	sim	sim	sim	quadro gripal	normal/normal	positivo	negativo		
		terceiro	6	38	15	não	não	sim	sim	sim	não	não	sim	não	sim	tosse, dispnéia	regular/normal	positivo	negativo		
		quarto	6	40	15	não	não	sim	sim	sim	não	não	sim	não	sim	tosse, coriza	regular/normal	positivo	Fungos em brotamento		
		quinto	3	52	22	não	não	não	não	não	não	não	não	sim	não	sim	normal/normal	positivo	<i>E.histolytica</i> , <i>G.intestinalis</i> , <i>B.hominis</i>		
		sexo	6	53	22	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	não	não	sim	sim	tosse	regular/normal	positivo	<i>G.intestinalis</i> , <i>B.hominis</i>
23997	4	olitivo	3	64	28	não	não	não	não	sim	sim	não	não	não	não	não	quadro gripal	normal/normal	negativo	<i>G.intestinalis</i> , <i>EPEC</i>	
		quinto	4	34	13	M	não	não	não	não	sim	sim	não	não	não	não	não	normal/normal	negativo	<i>G.intestinalis</i> , <i>EPEC</i>	
24072	1	sétimo	3	60	26	não	não	não	não	sim	sim	não	não	não	não	não	quadro gripal	normal/normal	negativo	<i>E.histolytica</i> , <i>T.typhimur</i> , <i>B.hominis</i>	
		olitivo	5	67	29	não	não	não	não	sim	sim	não	não	não	não	não	quadro gripal	normal/normal	negativo	<i>T.typhimur</i> , <i>B.hominis</i>	
		décimo	3	72	32	não	não	não	não	sim	sim	não	não	não	não	não	quadro gripal	normal/normal	negativo	<i>T.typhimur</i> , <i>B.hominis</i>	
24175	1	quarto	3	46	20	F	não	não	não	não	não	não	não	sim	não	não	sim	normal/normal	positivo	<i>G.intestinalis</i>	
		primeiro	5	39	17	M	sim	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não	não	sim	normal/normal	positivo	Fungos em brotamento
24240	2	NR	3	25	10	M	não	não	sim	sim	não	sim	sim	não	não	não	sim	desnutrido IV desidratado I	positivo	Fungos em brotamento, ETEC LT e S	
		quarto	3	53	24	não	não	não	não	sim	sim	não	não	não	não	não	não	sim	normal/normal	positivo	<i>G.intestinalis</i> , <i>T.typhimur</i> , <i>B.hominis</i> , <i>C.messili</i>
24383	3	NR	3	21	6	M	sim	sim	sim	não	não	não	não	sim	sim	sim	sim	normal/normal	negativo	negativo	
		quarto	3	29	10	não	não	sim	sim	sim	não	não	não	não	sim	sim	sim	sim	normal/normal	negativo	negativo
		quinto	3	52	23	não	não	sim	sim	sim	não	não	não	não	sim	sim	sim	sim	normal/normal	negativo	Fungos em brotamento
24415	2	primeiro	7	41	17	M	sim	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não	não	quadro gripal	normal/normal	positivo	negativo
		terceiro	5	76	34	não	sim	sim	sim	sim	sim	não	não	não	sim	sim	sim	sim	normal/normal	positivo	<i>A.lumbricoides</i>
24188	1	sexo	3	34	13	F	não	não	não	não	não	não	não	sim	sim	sim	sim	normal/normal	positivo	<i>G.intestinalis</i>	
		sétimo	3	53	26	F	não	não	sim	sim	sim	não	não	não	sim	sim	sim	sim	normal/normal	negativo	<i>A.lumbricoides</i> , <i>T.typhimur</i>
24145	2	olitivo	3	62	30	não	não	não	não	sim	sim	não	não	não	sim	sim	sim	normal/normal	negativo	<i>A.lumbricoides</i> , <i>T.typhimur</i> , <i>G.intestinalis</i>	
		quinto	3	27	9	M	não	não	sim	sim	não	não	não	sim	sim	sim	sim	sim	normal/normal	positivo	<i>E.nana</i>
24141	2	décimo	4	57	24	não	não	não	não	não	não	não	não	sim	sim	sim	sim	normal/normal	positivo	<i>E.nana</i>	
		quarto	3	27	9	M	não	não	sim	sim	não	não	não	sim	sim	sim	sim	sim	normal/normal	positivo	<i>E.nana</i>
24043	2	sexo	3	29	11	M	sim	sim	não	sim	sim	não	não	não	sim	sim	sim	normal/normal	negativo	Fungos em brotamento	
		olitivo	4	44	18	F	não	não	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não	não	normal/normal	positivo	<i>G.intestinalis</i>
24098	1	sétimo	4	49	22	F	sim	sim	sim	sim	sim	não	não	não	não	não	não	normal/normal	negativo	<i>G.intestinalis</i>	
		primeiro	4	26	10	F	não	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	normal/normal	negativo	<i>A.lumbricoides</i>
23982	1	primeiro	4	26	10	F	não	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	normal/normal	negativo	<i>A.lumbricoides</i>	

NOTA: NR = Não relatado

As porcentagens referentes à presença de cada patógeno individual encontrados nas 29 fezes diarréicas pode ser visualizada na tabela 9:

TABELA 9: Frequência de patógenos entéricos e concomitância com a presença de RVC, em 29 amostras sintomáticas de 14 crianças de Belém, de março 1983 a março 1986.

Patógeno entérico	% de pctes. diarréicos (Nº absoluto)	Nº de amostras com RVC e outro patógeno entérico
Rotavírus grupo C*	59% (17)	-
<i>E. coli</i> EPEC**	3% (1)	0
<i>E. coli</i> LT ETEC**	3% (1)	1
Fungos em brotamento	17% (5)	3
<i>Ascaris lumbricoides</i>	21% (6)	2
<i>Trichuris trichiura</i>	14% (4)	1
<i>Endolimax nana</i>	7% (2)	2
<i>Blastocystis hominis</i>	14% (4)	2
<i>Chilomastix mesnili</i>	3% (1)	1
<i>Entamoeba coli</i>	3% (1)	1
<i>Entamoeba histolytica</i>	7% (2)	1
<i>Giardia intestinalis</i> ***	38% (11)	7

* Detectados por RT-PCR para gene 5

** Categorias de *E. coli*: EPEC, enteropatogênica; ETEC -LT, enterotoxigênica expressando toxina termo-lábil e toxina termo-estável

*** Embora a nomenclatura comum para esta espécie seja *G. lamblia*, foram mantidas as nomenclaturas usadas nos prontuários médicos

Nas 29 amostras diarréicas, o RVC foi detectado em 17 amostras (59%); *E. coli* EPEC e ETEC LT, *Chilomastix mesnili* e *Entamoeba coli* foram encontrados em 1 amostra cada (3%); fungos em brotamento foram recuperados em 5 amostras (17%); *Ascaris lumbricoides* foram observados em 6 amostras (21%); *Trichuris trichiura* e *Blastocystis hominis* estavam presentes em 4 amostras (14%); *Endolimax nana* e *Entamoeba histolytica* em 2 amostras (7%) e *Giardia intestinalis* em 11 amostras (38%). A presença concomitante do RVC foi encontrada nas amostras com *E. coli* ETEC LT, *Chilomastix mesnili*, *Entamoeba coli* e *Endolimax nana*; em 3 amostras das 5 com fungos em brotamento; em 2 amostras das 6 com *Ascaris lumbricoides*; em 1 amostra das 4 com *Trichuris trichiura*; em 2 amostras das 4 com *Blastocystis hominis*, em 1 amostra das 2 com *Entamoeba histolytica* e em 7 amostras das 11 com *Giardia intestinalis*.

Somente em 4 das 17 amostras positivas para RVC não havia outros patógenos enteréricos associados (Tabela 9).

5.4 Determinação do perfil de excreção do rotavírus do grupo C e o comportamento do hospedeiro em 76 amostras de fezes de um mesmo paciente

Setenta e seis amostras, coletadas quinzenalmente e nos dias de presença de diarreia desde o nascimento até os três anos de idade do paciente ID N° 24006, foram analisadas por RT-PCR (gene 5). Apenas 9 amostras eram diarréicas, das quais, 6 tiveram seus correspondentes sintomas clínicos analisados anteriormente, em conjunto com as outras 23 amostras diarréicas de outras 13 crianças. O perfil de eliminação do RVC nas fezes desta criança pode ser observado nas figura 17.

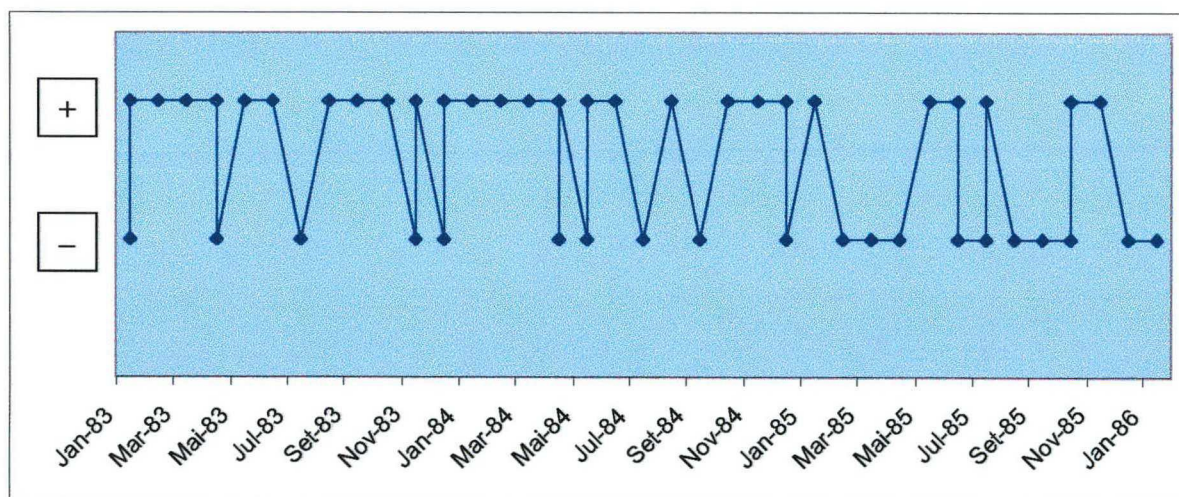


Figura 17: Acompanhamento mensal da presença de rotavírus do grupo C, detectados pelo método do RT-PCR (gene 5), em 76 amostras de fezes da criança ID N°24006, de Belém-do-Pará, de janeiro de 1983 a janeiro de 1986.

A presença do RVC nas fezes da criança ID N°24006 foi caracterizada desde o primeiro mês de vida, em janeiro de 1983, e permaneceu até início de abril do mesmo ano. No final do mês de abril houve uma supressão da eliminação dos vírus, mas a mesma voltou a eliminá-los nos meses de maio e junho. Em julho e início de agosto de 1983, o RVC não foi detectado nas

fezes desta criança, embora as infecções tenham reiniciado na metade do mês de agosto e permanecido até outubro. No início do mês de novembro, o resultado do RT-PCR foi negativo para RVC, mas nas amostras coletadas no meio e no final do mesmo mês, o resultado foi positivo. O mesmo fato ocorreu no mês de dezembro de 1983. Desde então, as amostras permaneceram positivas até o mês de março de 84. Durante todo este período, as infecções foram assintomáticas até que ocorreu o primeiro episódio de diarreia no início do mês de março de 84, quando a criança estava, então, no último dia de seus 13 meses de idade (amostra ID 35). Neste episódio a criança apresentou náuseas, vômitos, febre, indisposição geral, anorexia e sintomas respiratórios (quadro gripal) e o número médio de evacuações/dia foi 6; ela ainda estava sendo amamentada e não apresentou nenhum outro patógeno enterérico. No final do mesmo mês, o paciente teve outro episódio de diarreia e a detecção do RVC foi também positiva, porém, infortunadamente, o prontuário médico referente a este episódio não se encontrava disponível.

No início do mês de abril de 1984 ocorreu o terceiro episódio de diarreia. Desta vez, os únicos sintomas presentes, além da diarreia com 6 evacuações/dia, foram febre e desconforto respiratório (tosse e dispnéia). O paciente estava então com 15 meses de idade, e estava ainda sendo amamentado, porém seu estado nutricional foi classificado como regular. O exame das fezes apresentou apenas RVC. Ao final do mês de abril, uma amostra coletada foi negativa para rotavírus C; porém, cinco dias depois, ocorreu o quarto episódio de diarreia. Os sintomas presentes foram febre e sintomas respiratórios (tosse e coriza) além de 6 evacuações/dia. O estado nutricional permaneceu regular e o exame das fezes mostrou presença RVC e de fungos em brotamento.

O mês de maio de 1984 iniciou com amostra negativa, mas a amostra coletada ao final deste mês apresentou-se positiva e assim permaneceram as amostras do mês de junho. Em julho de 1984 ocorreu um episódio de diarreia; porém, desta vez o resultado do RT-PCR foi negativo para rotavírus do grupo C; o prontuário médico referente a este episódio não encontra-se disponível e, além disso, este deveria ter sido o quinto episódio de diarreia, porém os registros médicos consideram o quinto episódio aquele ocorrido somente em novembro do mesmo ano.

Em agosto de 1984, as amostras foram positivas e assintomáticas. Em setembro de 1984 a eliminação de RVC cessou, mas reiniciou em outubro e assim permaneceu até início de dezembro de 1984. Neste período, no mês de novembro de 1984, ocorreram dois episódios de diarreia; as fezes coletadas do quinto e do sexto episódio têm 17 dias de diferença, a criança

estava com 22 meses de idade e já não era mais amamentada. O quinto episódio (segundo registro médico, mas sexto segundo a seqüência lógica) foi caracterizado apenas pela diarréia 3 vezes ao dia e por indisposição geral. O sexto episódio (sexto segundo o registro médico, sétimo segundo a seqüência lógica) já apresentou sintomas como náuseas, vômitos, febre, dor abdominal, anorexia, 6 evacuações diárias e sintomas respiratórios (tosse). O estado nutricional foi classificado como regular e, embora os rotavírus do grupo C estivessem presentes, foram também detectados *Etamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* e *Blastocystis hominis* nas fezes ID 53.

A amostra coletada no final de dezembro de 1984 apresentou resultado negativo. Em janeiro de 1985, mais dois casos de infecção assintomática foram registrados. De fevereiro a abril deste ano não foi encontrado RVC nas amostras coletadas, embora em março tenha ocorrido um episódio de diarréia (segundo a seqüência lógica era o oitavo), este também não possui prontuário disponível.

Em maio de 1985 ocorreu o último episódio de diarréia (oitavo segundo registro médico, nono segundo a seqüência lógica) durante o período que compreendeu o estudo. Este apresentou resultado positivo para RVC, com febre, dor abdominal, 3 evacuações por dia e sintomas respiratórios (quadro gripal), além da presença de *Giardia intestinalis* nas fezes. As amostras permaneceram positivas, porém assintomáticas, até início de junho de 1985. No final deste mês até o início do mês de outubro, as amostras coletadas mostraram resultados negativos, com exceção de uma no mês de julho. Do final do mês de outubro até novembro de 1985 ocorreram, mais casos de amostras positivas e assintomáticas. As últimas amostras coletadas, em dezembro de 1985 e início de janeiro de 1986, quando a criança completou três anos de idade, apresentaram resultados negativos para o RVC.

5.5 Análises de RFLP

Foram escolhidos os produtos amplificados do *nested* PCR, para o gene 5 do RVC, de 16 amostras positivas (provenientes do grupo de 83 amostras de 30 crianças), de uma indeterminada e do controle positivo Cowden para serem digeridos com quatro enzimas de restrição: AluI, BglII, MboI e XbaI (GibcoBRL®). Estas amostras estavam divididas em grupos segundo as variáveis: idade (de 0 a 12 meses; de 13 a 24 meses; de 25 a 36 meses), tipo (diarréico; assintomático) e estação do ano (primavera, verão, outono, e inverno). De cada categoria foram escolhidas, aleatoriamente, 2 amostras para serem digeridas. Os resultados das digestões com as diferentes enzimas podem ser visualizados nas figuras 18 a 21.

A digestão do produto de 267pb do *nested* PCR do controle positivo Cowden com a enzima Mbo I produziu 2 segmentos de restrição de tamanho 104 e 162 pb, iniciando no nucleotídeo 1216, conforme a literatura (RIPENHOFF-TALTY et al., 1996). Entre as 16 amostras clínicas analisadas, 14 apresentaram o mesmo perfil de restrição que o controle positivo Cowden (Fig.18 A e B). Duas amostras (ID. Nº 24233-73 e 24002-75) apresentaram 3 sítios de reconhecimento da enzima, produzindo fragmentos com 104, 162 e 191pb (linha 1 fig. 18 B) e com 119, 153 e 175pb (linha 9 fig. 18 A). Esta última amostra apresentou, ainda, diversas outras bandas de digestão parcial, de menor intensidade e de tamanhos variados.

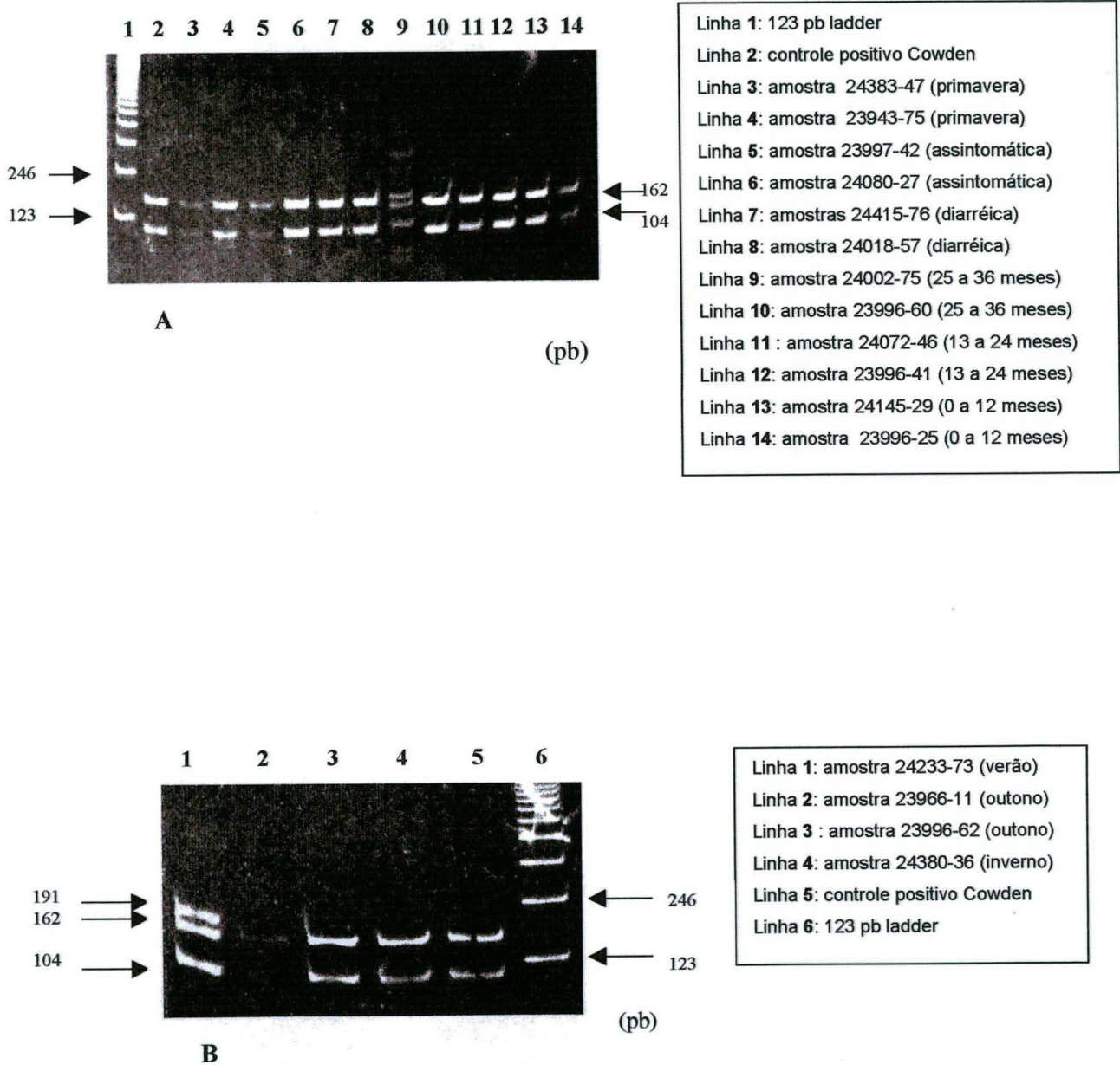
Após a digestão com a enzima Xba I, o produto de 267pb do *nested* PCR do controle positivo Cowden produziu segmentos de restrição de 112 e 155pb. Das 16 amostras clínicas, 14 apresentaram o mesmo perfil de restrição que o controle Cowden (Fig. 19 A e B). Duas amostras (ID. Nº 24233-73 e 24002-75) apresentaram os seguintes perfis: fragmentos com 112, 155 e 187pb (linha 1 fig. 19 B) e fragmentos com 227 e 392pb (linha 9 fig. 19 A).

O perfil encontrado para o controle Cowden, após digestão com Alu I, foi de 2 fragmentos com 109 e 127pb cada, conforme relato prévio na literatura (RIPENHOFF-TALTY et al., 1996). Das 17 amostras analisadas, 14 apresentaram perfis idênticos ao do controle (Fig. 20 A e B). Três amostras apresentaram diferenças nos perfis de restrição: a amostra Nº 24233-73 apresentou fragmentos de 155, 127 e 109pb (linha 2, fig.20 B); a amostra 24002-75 apresentou fragmentos de 168, 123 e 94pb (linha 9 fig.20 A) e a amostra 23996-60 apresentou fragmentos de 163, 127 e 109pb (linha 10, fig.20 A) .

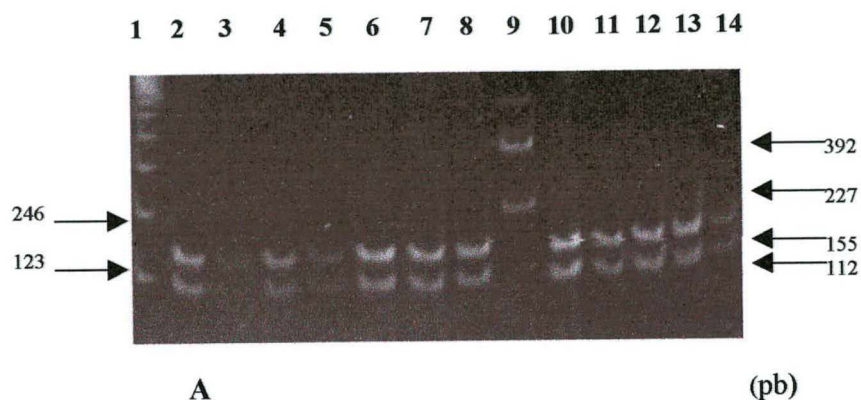
Nas digestões com a Bgl II foram observadas, tanto no controle quanto nas amostras, diversas bandas de digestão parcial, de intensidades semelhantes às daquelas de tamanho 104 e 162pb as quais eram esperadas , segundo a literatura (RIPENHOFF-TALTY et al., 1996). No

controle, e em 15 das 16 amostras analisadas, as bandas de digestão aparentemente mais marcantes (referentes aos 4 fragmentos de menor tamanho) apresentaram 524, 456, 162 e 104pb (Fig. 21 A e B). A amostra Nº 24233-73 apresentou, ainda, dois fragmentos a mais, de igual intensidade que os demais, de 567 e 202 pb (Linha 2, figura 21 B) .

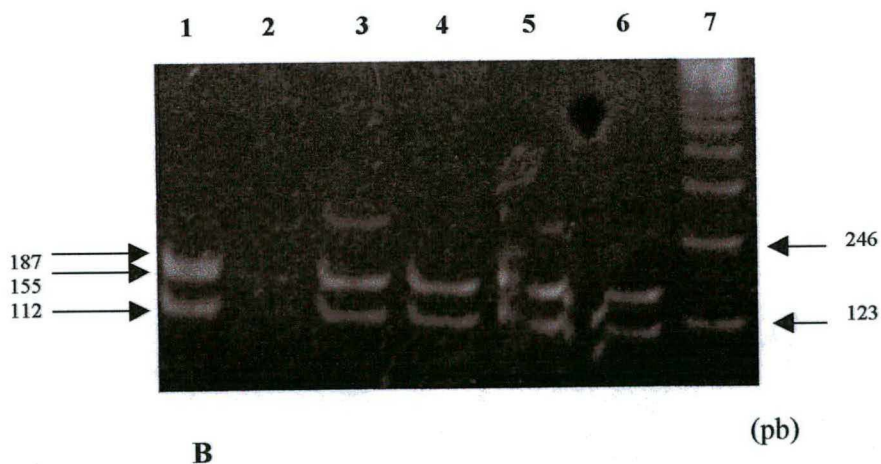
Foi também realizada digestão com a enzima Xba I, dos produtos do *nested* PCR de 21 amostras da criança Nº24006, classificadas segundo a distribuição mensal. Uma amostra positiva de cada mês foi escolhida para a digestão. Os perfis de restrição das amostras foram comparados com o perfil obtido para o controle Cowden, consistindo de dois fragmentos com 112 e 155pb cada. Os perfis das amostras de todos os meses analisados foram iguais aos do controle Cowden (Fig. 22 A e B).



Figuras 18 A e B: Perfis de restrição obtidos com a enzima Mbo I, no controle positivo Cowden, em 16 amostras positivas para o gene 5 do rotavírus do grupo C, e em 1 amostra com resultado indeterminado por RT-PCR, coletadas de 30 crianças de Belém, durante março de 1983 a março de 1986; divididas conforme as categorias dos grupos de variáveis: idade, tipo de fezes e estação do ano.

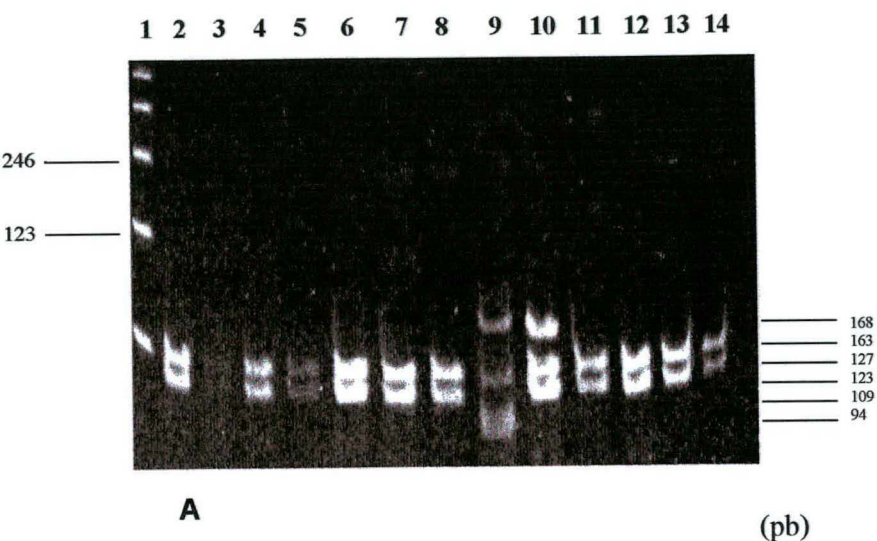


Linha 1: 123 pb ladder
 Linha 2: controle positivo Cowden
 Linha 3: amostra 24383-47 (primavera)
 Linha 4: amostra 23943-75 (primavera)
 Linha 5: amostra 23997-42 (assintomática)
 Linha 6: amostra 24080-27 (assintomática)
 Linha 7: amostras 24415-76 (diarréica)
 Linha 8: amostra 24018-57 (diarréica)
 Linha 9: amostra 24002-75 (25 a 36 meses)
 Linha 10: amostra 23996-60 (25 a 36 meses)
 Linha 11 : amostra 24072-46 (13 a 24 meses)
 Linha 12: amostra 23996-41 (13 a 24 meses)
 Linha 13: amostra 24145-29 (0 a 12 meses)
 Linha 14: amostra 23996-25 (0 a 12 meses)

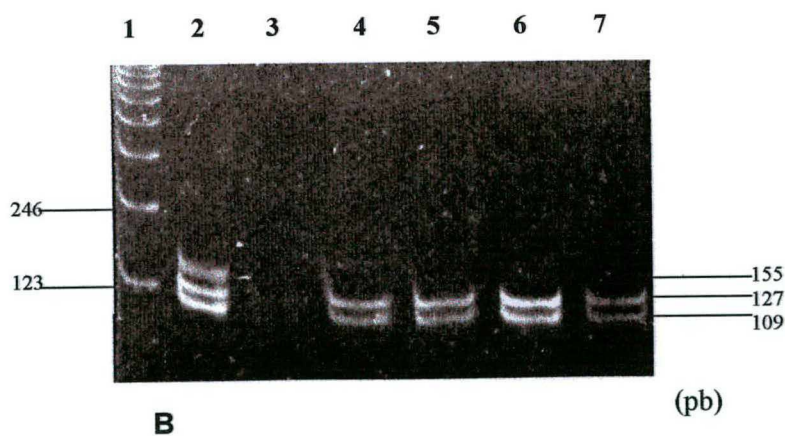


Linha 1: amostra 24233-73 (verão)
 Linha 2: amostra 23966-11 (outono)
 Linha 3 : amostra 23996-62 (outono)
 Linha 4: amostra 24380-36 (inverno)
 Linha 5: amostra 24018-46 (inverno)
 Linha 6: controle positivo Cowden
 Linha 7: 123 pb ladder

Figuras 19 A e B: Perfis de restrição obtidos com a enzima Xba I, no controle positivo Cowden, em 16 amostras positivas para o gene 5 do rotavírus do grupo C, e em 1 amostra com resultado indeterminado por RT-PCR, coletadas de 30 crianças de Belém, durante março de 1983 a março de 1986; divididas conforme as categorias dos grupos de variáveis: idade, tipo de fezes e estação do ano.

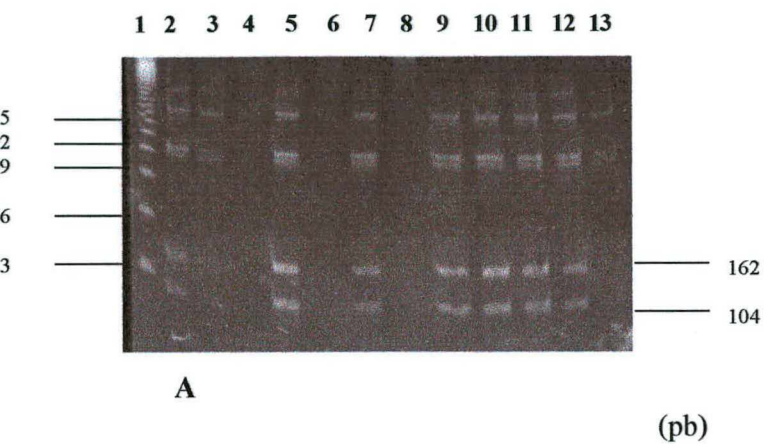


Linha 1: 123 pb ladder
 Linha 2: controle positivo Cowden
 Linha 3: amostra 24383-47 (primavera)
 Linha 4: amostra 23943-75 (primavera)
 Linha 5: amostra 23997-42 (assintomática)
 Linha 6: amostra 24080-27 (assintomática)
 Linha 7: amostras 24415-76 (diarréica)
 Linha 8: amostra 24018-57 (diarréica)
 Linha 9: amostra 24002-75 (25 a 36 meses)
 Linha 10: amostra 23996-60 (25 a 36 meses)
 Linha 11 : amostra 24072-46 (13 a 24 meses)
 Linha 12: amostra 23996-41 (13 a 24 meses)
 Linha 13: amostra 24145-29 (0 a 12 meses)
 Linha 14: amostra 23996-25 (0 a 12 meses)

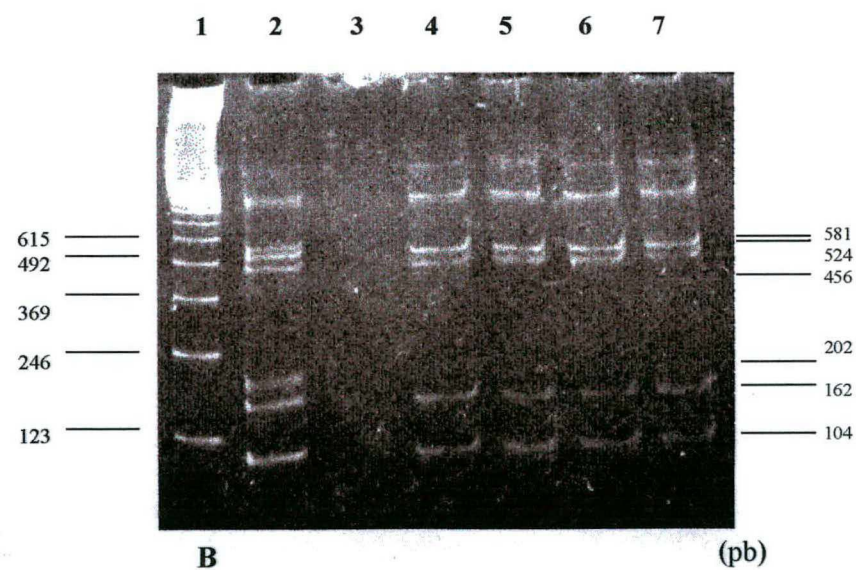


Linha 1: 123 pb ladder
 Linha 2: amostra 24233-73 (verão)
 Linha 3: amostra 23966-11 (outono)
 Linha 4 : amostra 23996-62 (outono)
 Linha 5: amostra 24380-36 (inverno)
 Linha 6: amostra 24018-46 (inverno)
 Linha 7: controle positivo Cowden

Figuras 20 A e B: Perfis de restrição obtidos com a enzima *Alu I*, no controle positivo Cowden, em 16 amostras positivas para o gene 5 do rotavírus do grupo C, e em 1 amostra com resultado indeterminado por RT-PCR; coletadas de 30 crianças de Belém, durante março de 1983 a março de 1986; divididas conforme as categorias dos grupos de variáveis: idade, tipo de fezes e estação do ano.

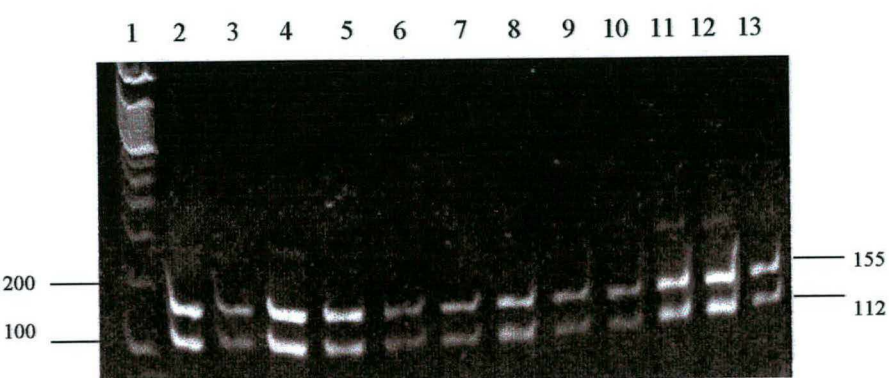


Linha 1: 123 pb ladder
 Linha 2: controle positivo Cowden
 Linha 3: amostra 23943-75 (primavera)
 Linha 4: amostra 23997-42 (assintomática)
 Linha 5: amostra 24080-27 (assintomática)
 Linha 6: amostra 24415-76 (diarréica)
 Linha 7: amostra 24018-57 (diarréica)
 Linha 8: amostra 24002-75 (25 a 36 meses)
 Linha 9: amostra 23996-60 (25 a 36 meses)
 Linha 10: amostra 24072-46 (13 a 24 meses)
 Linha 11: amostra 23996-41 (13 a 24 meses)
 Linha 12: amostra 24145-29 (0 a 12 meses)
 Linha 13: amostra 23996-25 (0 a 12 meses)

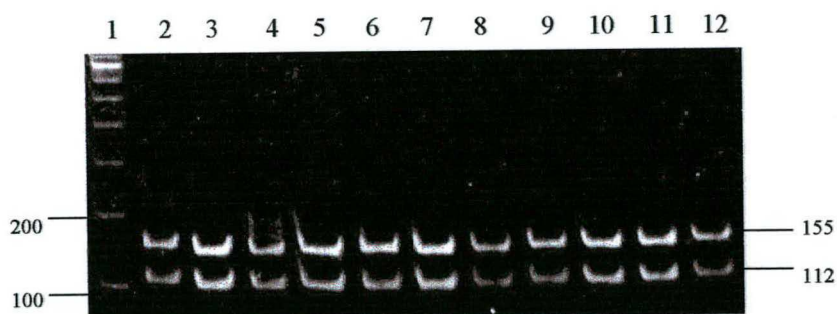


Linha 1: 123 pb ladder
 Linha 2: amostra 24233-73 (verão)
 Linha 3: amostra 23966-11 (outono)
 Linha 4: amostra 23996-62 (outono)
 Linha 5: amostra 24380-36 (inverno)
 Linha 6: amostra 24018-46 (inverno)
 Linha 7: controle positivo Cowden

Figuras 21 A e B: Perfis de restrição obtidos com a enzima Bgl II no controle positivo Cowden, em 16 amostras positivas para o gene 5 do rotavírus do grupo C, e em 1 amostra com resultado indeterminado por RT-PCR, coletadas de 30 crianças de Belém, durante março de 1983 a março de 1986; divididas conforme as categorias dos grupos de variáveis: idade, tipo de fezes e estação do ano.



Linha 1: 100 pb ladder
 Linha 2: amostra ID 02; Jan. 83
 Linha 3: amostra ID 10; Fev. 83
 Linha 4: amostra ID 12; Mar. 83
 Linha 5: amostra ID 14; Abr. 83
 Linha 6: amostra ID 17; Mai. 83
 Linha 7: amostra ID 19; Jun. 83
 Linha 8: amostra ID 23; Ago. 83
 Linha 9: amostra ID 25; Set. 83
 Linha 10: amostra ID 29; Nov. 83
 Linha 11: amostra ID 31; Dez. 83
 Linha 12: amostra ID 33; Jan. 84
 Linha 13: controle positivo Cowden



Linha 1: 100 pb ladder
 Linha 2: amostra ID 37; Mar. 84
 Linha 3: amostra ID 40; Abr. 84
 Linha 4: amostra ID 44; Jun. 84
 Linha 5: amostra ID 48; Ago. 84
 Linha 6: amostra ID 51; Out. 84
 Linha 7: amostra ID 54; Dez. 84
 Linha 8: amostra ID 57; Jan. 85
 Linha 9: amostra ID 66; Jun. 85
 Linha 10: amostra ID 75; Out. 85
 Linha 11: amostra ID 77; Nov. 85
 Linha 12: controle positivo Cowden

B

Figuras 22 A e B: Perfis de restrição obtidos com a enzima Xba I no controle positivo Cowden e em 21 amostras positivas por RT-PCR para o gene 5 do rotavírus do grupo C, da criança N°24006 de Belém, segundo o mês e ano da coleta.

6. DISCUSSÃO

Estudos prévios de detecção de rotavírus, realizados na região de Belém do Pará, haviam relatado a incidência de rotavírus do grupo A (RVA), em crianças da comunidade (LINHARES et al., 1989; MASCARENHAS et al., 1998) e em crianças hospitalizadas (LINHARES et al., 1983; MASCARENHAS et al., 1999), e a incidência de rotavírus do grupo C causando episódios esporádicos de diarreia em duas crianças (GABBAY et al., 1989) e causando surtos de diarreia em creches de crianças carentes (GABBAY et al., 1999). Surtos de gastroenterites associadas aos RVC foram descritos em todo o mundo (OISHI et al., 1993; CHEN et al., 1988; PENARANDA et al., 1989; SOUZA et al., 1998). Porém, estudos prévios de soroprevalência (ISHIMARU et al., 1991; JAMES et al., 1997; NILSSON et al., 2000a) sugerem que a exposição de humanos ao RVC é maior do que aquela baseada nas taxas de detecção dos mesmos. Além disso, a grande maioria dos estudos envolve crianças com mais de 5 anos de idade ou adultos (GABBAY et al., 1999). Contudo, o RVC foi também associado a infecções em lactentes (PENARANDA et al., 1989; CAUL et al., 1990; JIANG et al., 1995).

O presente trabalho objetivou investigar a incidência endêmica, num período de três anos, e o período pré-patogênico da História Natural do RVC, em crianças menores de 3 anos de idade numa comunidade de Belém do Pará. Isto, através da detecção por RT-PCR e comparação com resultados de ELISA previamente obtidos, do RVC nas fezes coletadas de crianças regularmente acompanhadas, durante a vigência de um estudo longitudinal prospectivo. Paralelamente, procurou-se evidenciar, através da análise de PCR-RFLP, a existência de diferenças genômicas entre as cepas do RVC presentes nestas amostras. No primeiro momento, serão discutidos os resultados obtidos com os ensaios de RT-PCR, a comparação com os resultados de ELISA, e os resultados da análise dos dados clínicos nos casos sintomáticos de infecção por RVC. Em seguida, serão discutidos os resultados obtidos pela utilização da técnica de PCR-RFLP.

6.1 Ensaios envolvendo a técnica de RT-PCR.

A técnica do RT-PCR, capaz de detectar ácido nucléico viral presente em amostras clínicas, é particularmente útil para detecção de vírus que não possam ser cultivados *in vitro*, como é o caso dos RVC.

O procedimento usado para preparar o RNA viral das fezes envolve desproteinização com fenol-clorofórmio e precipitação em etanol, que é o método normalmente utilizado para preparar RNA genômico de rotavírus para análises eletroforéticas em PAGE (GOUVEA et al., 1991). Este tratamento, contudo, não é suficiente para eliminar substâncias presentes em materiais biológicos, tais como as fezes, que podem inibir reações enzimáticas subsequentes envolvendo as enzimas transcriptase reversa e Taq polimerase. A remoção destes inibidores é importante e inúmeras técnicas foram descritas (XU et al., 1990; WILDE et al., 1990; GOUVEA et al., 1991). No presente trabalho, a extração dos RNAs dupla fita do RVC foi realizada, inicialmente, com triclorotrifluoretano (Freon 113) para remoção de muco e lipídeos das fezes e, posteriormente, através de duas metodologias seqüenciais: extração com fenol-clorofórmio, e uma segunda etapa de extração do RNA, utilizando um produto comercial da Gibco BRL, o Trizol™. Apesar disso, os produtos das reações de primeiro PCR, a partir de cDNAs transcritos dos RNAs de amostras clínicas, não foram visíveis em gel de eletroforese corado, ao contrário dos produtos gerados a partir de RNA de fluido viral (controle Cowden) que puderam ser visualizados (Figura 6). Isto leva a crer que, possivelmente, o duplo processo de extração dos RNAs não foi capaz de eliminar completamente os inibidores, e os produtos gerados em 1ºPCR estavam em quantidades inferiores às mínimas requeridas para visualização em gel após eletroforese. Assim, uma etapa de amplificação posterior (*nested* PCR) foi necessária para permitir a diluição dos inibidores ainda presentes no meio reacional, e também para aumentar a sensibilidade do método (GOUVEA et al., 1991), com o aumento do número de cópias do mesmo segmento gênico, compreendido entre as regiões de anelamento do par de iniciadores C2/C3, conforme observado na Fig. 7. Tendo em vista que, todo o procedimento de extração (com exceção de algumas amostras para as quais foi necessário repetir as extrações utilizando as suspensões fecais reservas – contra-prova) foi realizado anterior à realização das reações de amplificação, não foi possível testar se somente a reação de *nested* PCR seria eficaz na detecção do RVC, sem a prévia realização da segunda etapa de extração dos RNAs virais. O RNA do fluido viral do controle Cowden foi extraído, tanto pelo processo de dupla extração quanto somente pelo Trizol™, e em ambas as situações apresentou-se visível após amplificação *nested*, porém, como o RNA extraído deste material provém de uma cultura celular

livre de inibidores, este não oferece parâmetros para avaliar alguma irrelevância da segunda extração realizada com Trizol™.

O problema mais sério encontrado na realização do PCR é a contaminação de reagentes ou de amostras, com DNA previamente amplificado (KWOK E HIGUCHI, 1989; CIMINO et al., 1990; SARKAR E SOMMER, 1991; ZHU et al., 1991; PRINCE E ANDRUS, 1992; RYS E PERSING, 1993; VISCIDI et al., 1993; RITZLER et al., 1999), causando erros sistemáticos, ou ainda, a contaminação individual de recipientes de reações, durante os procedimentos preparativos, levando a resultados falso-positivos, esporádicos (CIMINO et al., 1990).

Durante o trabalho inicial de realização das reações de PCR, ocorreram alguns casos de controle negativo com resultado positivo (Fig. 10). Por esta razão, uma série de investigações foram iniciadas, com o propósito de eliminar as possíveis causas da contaminação e de evitar futuros problemas, objetivando eliminar a possibilidade de gerar resultados falso-positivos. Isto originou uma seqüência de procedimentos de precaução e de testes de comprovação de hipóteses relacionadas aos possíveis contaminantes, que tiveram que ser realizadas anteriormente ao processamento das outras amostras que ainda não haviam sido testadas. A constatação da eficácia dos procedimentos adotados na eliminação dos contaminantes foi feita através da comprovação de resultado negativo para o controle negativo em baterias feitas exclusivamente com os controles. Após a realização dos testes de investigação e da adoção de novos procedimentos, as amostras anteriormente processadas, que apresentaram resultado positivo pela técnica do RT-PCR, foram novamente testadas, até que pudessem ser resolvidas em baterias cujos controles estivessem adequados (BOBO et al., 1997). Originando uma série de exaustivas repetições.

A seqüência de procedimentos e de testes ocorreram conforme explicado abaixo:

- 1) As primeiras baterias em que o controle negativo apresentou resultado positivo, tinham também amostras com resultados negativos. Estas amostras, *a priori*, descartaram a possibilidade de reativos contaminados, pois se fosse o caso, todas as amostras apresentariam resultados positivos. Assim, as micropipetas, que eram utilizadas nas etapas de transferência de material genético, foram autoclavadas, a 121°C, por 20 min. Como o controle negativo, realizado posteriormente a este procedimento, permaneceu positivo e, de fato, uma única molécula de ácido nucléico é prontamente amplificável e também quimicamente resistente às temperaturas de autoclavação (CIMINO et al., 1990), as bancadas onde eram preparadas as reações passaram a ser limpas com uma solução de hipoclorito 2.500 ppm a qual, segundo a

literatura (OJEH et al., 1995) é capaz de destruir completamente tanto a infectividade viral quanto o RNA amplificável por PCR dos rotavírus. As micropipetas com dispositivo de ar, como as que foram utilizadas para realizar este trabalho, correm o risco de serem contaminadas com a entrada de aerossóis ou líquidos no seu interior, levando à contaminação de amostras pipetadas subsequente (KOLARI et al, 1999). Sendo assim as ponteiros com filtros, os quais funcionam como barreiras físicas de proteção ao efeito aerossol, passaram a ser utilizadas nas etapas das reações onde o material genético estava presente.

2) A princípio, o resultado do controle negativo observado no teste posterior apresentou-se negativo. Assim, foram realizadas baterias subsequentes de repetição de amostras anteriormente positivas. Nestas baterias, os resultados dos controles encontravam-se adequados. Porém, posteriormente, o controle negativo voltou a apresentar resultado positivo mas, desta vez, todas as amostras também.

3) Em vista disto, a hipótese de que algum dos reativos tivesse sido contaminado, a despeito dos cuidados tomados em relação à alíquotagem de reativos e de manuseio mínimo dos frascos de reativos e amostras, não mais poderia ser descartada. A dúvida inicial era saber em qual das etapas o DNA contaminante estava presente. Inicialmente suprimiu-se a etapa de transcrição reversa, realizando-se diretamente o PCR. O resultado foi positivo e, então, o reativo contaminado fazia parte dos componentes das reações de PCR. As alíquotas em uso de iniciadores foram testadas, utilizando-se alíquotas completamente novas dos demais reativos. Os testes mostraram que o par C1/C4 foi capaz de produzir resultado positivo para uma amostra de água enquanto que o par C2/C3 não. Aqueles foram substituídos por novas alíquotas preparadas a partir de solução mãe estoque. Uma outra questão que foi levantada em vista daqueles resultados, foi a possibilidade de estarem ocorrendo reações inespecíficas com os iniciadores utilizados. Para resolver esta questão, foi realizado um *pool* de controles positivos, e um *pool* de controles negativos falso-positivos e ambos foram digeridos com endonucleases, para as quais esperava-se observar sítios de reconhecimento específico no *pool* de controle positivo; se o segmento gênico presente no *pool* de controles negativos fosse produto de reação inespecífica, não haveriam sítios de reconhecimento, ou se houvessem, não teriam o mesmo tamanho que aqueles obtidos do Cowden (controle positivo). O perfil observado em ambos os *pools* foi idêntico, descartando a possibilidade de estar ocorrendo reações inespecíficas com os iniciadores utilizados.

4) Paralelamente à troca de alíquotas de C1/C4, para eliminar possíveis fontes de contaminação, a centrifugação e as caixas de isopor onde os tubos eram acondicionados

durante o preparo das reações, foram limpas com solução de hipoclorito 2.500 ppm, o material amplificado passou a ser guardado em locais distintos dos congeladores onde estavam armazenados os reativos, e as ponteiros com filtros passaram a ser usadas também no preparo da mistura de reação.

5) Embora após estes procedimentos, algumas baterias tenham sido realizadas com os controles mostrando resultados adequados, o problema reapareceu. Testes de reativos foram realizados, trocando-se as alíquotas por outras recém preparadas e usando novas enzimas M-MLV RT e Taq Polimerase. Além disso, por haver dúvida se as ponteiros com filtros eram eficazes quando usadas em uma pipeta (supostamente) previamente contaminada, uma micropipeta nova passou a ser usada para as transferências de material genético, e as demais micropipetas passaram por um processo de descontaminação, que consiste na imersão das partes inferiores das mesmas em tampão glicina HCl, pH 2,0 levadas à ebulição por 20 min, conforme procedimento recomendado pelo Suporte Técnico do fabricante Eppendorf®.

O conjunto de medidas adotado foi eficaz quanto à eliminação do DNA contaminante (DNA *carry-over*), de modo que as demais amostras puderam ser processadas com segurança. Então, os resultados obtidos com as amostras clínicas foram considerados definitivos somente quando o controle negativo, realizado em todas as reações, apresentou-se negativo. Ainda assim, tomou-se o cuidado de afirmar, em caso de amostras positivas, que as mesmas assim o são para o gene 5 do rotavírus do grupo C, o qual foi detectado com a utilização dos iniciadores selecionados para este estudo. As mesmas amostras deveriam, contudo, ter sido testadas para outro gene do rotavírus do grupo C, para uma adicional confirmação da positividade por RT-PCR. Entretanto, os resultados obtidos para o gene 5 do RVC, puderam ser comprovados com a metodologia de ELISA, anteriormente realizada.

6.2 Análises de patogenicidade, incidência, distribuição temporal e sazonalidade dos RVC, na região de Belém do Pará

O teste do Qui-quadrado foi selecionado para realizar as análises estatísticas deste trabalho, porque os resultados obtidos são de natureza qualitativa, e tais dados não são mensurados numericamente, mas sim, indicam certas qualidades, ou atributos, de tal forma que pode-se alocar cada elemento numa categoria pré-estabelecida, resultando em dados categorizados (BARBETA, 1994). Um dos propósitos deste estudo foi verificar se duas ou mais

variáveis apresentavam-se associadas e se, por estarem associadas, uma altera a probabilidade de algum resultado da outra.

A patogenicidade do RVC, em 153 amostras de fezes, foi avaliada através da presença ou ausência de diarreia. Resultados positivos por RT-PCR (gene 5) para rotavírus do grupo C foram encontrados em 95 amostras, das quais apenas 18 (19%) eram diarreicas, o que não é estatisticamente distinto de 14 amostras (24%) também diarreicas, porém, negativas para rotavírus do grupo C (Fig.8). Tais dados da região norte do Brasil corroboram os relatos prévios da literatura em outras localizações geográficas, os quais afirmam ser a frequência de diarreia causada por RVC mais baixa do que a frequência de diarreia causada RVA (MACKOW et al., 1995; TEIXEIRA et al., 1998). Ademais, o fato dos 18 casos sintomáticos de infecções causadas por rotavírus do grupo C, terem ocorrido em episódios de diarreia esparsos, está de acordo com relatos prévios que afirmam que o RVC tem sido mais frequentemente associado a casos esporádicos de gastroenterites (PENARANDA et al, 1989; USHIJIMA et al., 1989; OISHI et al., 1993; RASOOL et al., 1994; JIANG et al., 1995; HAMANO et al., 1999). TIMENETSKY et al. (1993) e MACKOW et al. (1995) relataram, anteriormente, a presença do RVC em amostras de fezes assintomáticas. Em vista disto, SOUZA et al. (1998) enfatizou a necessidade de mais estudos em indivíduos com e sem diarreia durante epidemias sem causa aparente.

Para os cálculos de incidência anual (coeficientes de ataque) do RVC foi necessário realizar um ajuste nas durações dos anos, visto que o acompanhamento das crianças e as coletas das fezes iniciaram no início de março de 1983 e terminaram no final de março de 1986. As amostras coletadas entre 01/03/83 até 31/03/84 foram enquadradas no primeiro ano de estudo (83); entre 01/04/84 até 31/03/85 no segundo ano (84); e entre 01/04/85 até 31/03/86 no terceiro ano (85). Com esta classificação, o primeiro ano de estudo compreendeu 13 meses de acompanhamento. Isto foi devido ao fato que a primeira amostra coletada data de 07/03/83 enquanto que a última data de 31/03/86, assim a duração do estudo ultrapassou em 24 dias o período de três anos. Estes 24 dias foram compensados com um mês a mais na duração do primeiro ano de acompanhamento. Ainda, visto que as 30 crianças acompanhadas neste estudo, nasceram todas num período de 6 meses, uma faixa de idade estava sendo compreendida em cada ano de estudo. Porém, houve a existência de zonas de intercalação de idade nos diferentes anos, tais como as idades de 12 a 14 meses, e de 25 a 26 meses (Tabela 7). Isto foi devido a que os nascimentos ocorreram entre outubro de 1982 e março de 1983, assim, havia crianças com até 6 meses de diferença de idade uma da outra, em uma mesma época sendo analisada.

A incidência anual, e a incidência acumulada, de crianças infectadas por RVC, e de crianças com diarreia causada por RVC na região de Belém do Pará, foi expressa através dos coeficientes de ataque (CA). Os coeficientes, medidas usuais em epidemiologia, expressam o risco de uma população apresentar determinada doença (LAURENTI, 1996). O denominador da razão que determina o CA, foi selecionado em relação ao total de crianças acompanhadas durante os três anos do estudo longitudinal (71), e não somente em relação às crianças estudadas no presente estudo (30), para que tal resultado pudesse ser extrapolado para a população. O maior CA para crianças infectadas por RVC, foi observado no ano de 1984, sendo de 9%. Da mesma forma, o CA para crianças que desenvolveram diarreia por RVC foi maior em 1984, sendo de 4,2%. A hegemonia deste ano em relação aos outros está relacionada com a faixa etária em que as crianças encontravam-se neste ano, de 2 a 14 meses, como será discutido posteriormente. O CA cumulativo de crianças infectadas por RVC, em um período de três anos, foi de 10%, e o CA cumulativo de crianças que desenvolveram diarreia causada por RVC foi de 5%. Isto indica que, em três anos, 10 crianças em cada 100, de 0 a 36 meses de idade, na região suburbana de Belém, correram o risco de serem infectadas pelo RVC; e destas, 5 o risco de desenvolver diarreia. Estes números, entretanto, excluem a ocorrência de reinfecções e foi demonstrado que as reinfecções por RVC são comuns na localização geográfica onde o estudo foi realizado, uma vez que em um grupo de 30 crianças, 95 amostras, coletadas num período de três anos, foram positivas para RVC.

Contrariando a suposição de JAMES et al., 1998, que sugere que, como o RVC parece pertencer a um único genótipo (VP7), seria improvável que ocorram reinfecções, como no caso dos RVA. Neste último grupo, a proteína majoritária do capsídeo externo VP7 é o principal determinante sorotípico e, portanto o antígeno de superfície mais variável. Estudos de hibridização cruzada sugerem que, como o RVA, há também variação significativa na seqüência do gene que codifica a VP7 entre os diferentes RVCs humano e animal (JIANG et al., 1991) classificando-os, tais como os do grupo A, em sorotipos distintos (tipos G). Até o momento, há pelo menos 3 sorotipos descritos: porcino, linhagens Cowden e HF, e bovino, linhagem Shintoku (TSUNEMITSU et al., 1992). Uma diferença minoritária de aminoácidos na VP7 dos RVCs indicam que a evolução deste grupo é lenta (JIANG et al., 1995; GRICE et al., 1994, NILSSON et al., 2000b, CASTELLO et al., 2000). Entretanto, se tais diferenças minoritárias incorrem em propriedades antigênicas distintas, necessitam de estudos adicionais (NILSSON et al., 2000). Além disso, os mecanismos de defesa imunológica contra os rotavírus não foi ainda bem estabelecido (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1998).

No grupo total de 71 crianças de Belém do Pará, acompanhadas durante o estudo longitudinal prospectivo, foram observados 441 episódios de diarreia, dos quais 7,9% foram causados por RVA (LINHARES et al., 1989) enquanto que o RVC foi detectado em 3,6% dos episódios de diarreia. Dados semelhantes foram obtidos de um estudo realizado em ambiente hospitalar nos EUA. Foram coletadas amostras de fezes de 233 crianças diarreicas, menores do que 2 anos de idade, admitidas em um hospital em Rhode Island, e de 91 controles (crianças hospitalizadas que não tinham diarreia) num total de 1676 fezes diarreicas. Todas foram testadas para RVA, sendo que 16,6% foram positivas. Do total de 1397 amostras com resultado negativo para RVA, 36 amostras foram positivas para rotavírus por ME, destas, 16 tinham material suficiente para testes para presença de RVC tanto por ELISA sanduíche com soro hiperimune de captura de VP6, quanto por RT-PCR gene 8. Todas foram positivas para RVC, 7 destas adquiriram a infecção na comunidade (4,7%), e 8 adquiriram após o internação. (JIANG et al., 1995). O CA cumulativo em 4 anos, de crianças com diarreia causada por RVC (adquirido na comunidade), na faixa etária de até dois anos de idade, foi de 3,4%.

A distribuição temporal, associada à idade, das infecções causadas pelo RVC foi analisada pela frequência de casos positivos e, de casos de diarreia, referentes a cada faixa etária, as quais puderam ser observados na figura 11. A comparação entre as frequências de cada faixa de idade foi analisada pelo teste do X^2 . A princípio, notoriamente, as crianças mais susceptíveis à infecção pelo RVC foram aquelas compreendidas no intervalo de idade de 13 a 24 meses. Porém, não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre as frequências de casos positivos para RVC nas diferentes faixas etárias. Isto se deve a que, em termos de proporção, 30 casos positivos (73%) num total de 41 amostras enquadradas na faixa de 13 a 24 meses, não é significativamente diferente de 11 casos positivos (61%) em 18 amostras na faixa de 0 a 12, e nem mesmo de 11 casos positivos (46%) em 24 amostras na faixa de 25 a 36 meses. Além disso, como as amostras analisadas neste trabalho foram selecionadas após um rastreamento por ELISA para RVC, elas não foram selecionadas ao acaso. Por esta razão, os dados observados nesta amostragem não podem, estatisticamente, serem extrapolados para a população em geral. Porém, podem dar noção de que, de fato, na região suburbana de Belém do Pará, entre uma faixa etária de 0 a 36 meses de idade, a mais susceptível é aquela compreendida entre 13 e 24 meses. A proporção de casos de diarreia em relação às amostras positivas para RVC, foi de 40% na faixa de idade de 13 a 24 meses, sendo esta proporção, também maior nesta faixa do que nas outras (11% na faixa de 0 a 12 meses, e 8% na faixa de 25 a 36 meses). Outro estudo realizado em Valentim Gentil, em São Paulo, mostrou que entre crianças de 0 a 5 anos, a faixa etária mais

atingida por diarreia, causada por RVC, foi aquela compreendida entre 1 e 4 anos de idade, contabilizando 21% do total de amostras diarreicas (SOUZA et al., 1998). Estes dados sugerem que as crianças com até 1 ano de idade, as quais possivelmente alimentam-se mais do leite materno do que de outros alimentos manipulados, estão menos susceptíveis às infecções por RVC do que as crianças mais velhas. BISHOP et al., 1996b mostraram um título médio alto de IgA anti-rotavírus presente no leite materno, embora a variação tenha sido grande entre as mães estudadas. No mesmo estudo, o aumento de anticorpos neutralizantes rotavírus-específicos no leite ocorreu em 40% das mães de crianças com até 17 meses com infecção por rotavírus. Noutro estudo, CLEMENS et al., 1993 concluiu que a alimentação feita exclusivamente com a amamentação previne a infecção por rotavírus em crianças no primeiro ano de vida. Porém esta é meramente adiada, ocorrendo durante o segundo ano de vida. Ainda, outro fator que pode explicar a menor susceptibilidade das crianças com menos de um ano às infecções por RVC é que, nesta idade, elas ainda não têm contato direto com o chão, com o ato de engatinhar e, relata-se que o chão têm uma baixa eficiência em adsorver as partículas de rotavírus (GOYAL E GERBA, 1979), onde os rotavírus mantém a infectividade (KESWICK E GERBA, 1980) podendo permanecer viáveis por muitos dias em superfícies inanimadas, sendo prontamente transferidos destas superfícies para as mãos (SATTAR et al., 1994). Outro estudo mostrou que 5 (63%) de 8 voluntários tomaram-se infectados após tocar com um dedo uma superfície contaminada e levá-lo à boca (WARD et al., 1991).

Inúmeros relatos prévios descreveram que os RVCs infectam crianças mais velhas ou adultos, mas raramente lactentes (von BONSDORFF et al., 1988; MATSUMOTO et al., 1989; BROWN et al., 1989; ISHIMARU et al., 1991; KUZUYA et al., 1998; OISHI et al., 1993; NILSSON et al., 2000b). Ainda, OISHI et al., 1993 afirma que crianças maiores do que 4 anos possuem um grande risco de serem infectadas por RVC, em contraste com a infecção por RVA que é comum entre crianças menores de 3 anos de idade (deZOYSA et al., 1985; ISHIMARU et al., 1991). Este trabalho porém, demonstrou a presença do RVC em amostras de fezes de crianças com menos de 3 anos de idade, de acordo com PENARANDA et al., 1989; CAUL et al., 1990 e JIANG et al., 1995; JAMES et al., 1998 GABBAY et al., 1999 que afirmam que estes vírus podem ser encontrados em lactentes.

A sazonalidade das infecções causadas pelo RVC, na região de Belém do Pará, foi também avaliada. A frequência mensal dos casos positivos para RVC foi demonstrada, em cada um dos anos de estudo, nas figuras 12-15. Foram encontrados casos positivos de rotavírus do grupo C em todos os meses que constituem um ano, não apresentando aumento significativo da

incidência deste agente em nenhum dos meses estudados. Os RVC na região de Belém do Pará não apresenta sazonalidade definida, ocorrendo em igual proporção durante todo o ano. Isto se deve a que, na região norte do Brasil, as estações do ano caracterizam-se por estação seca e chuvosa, não apresentando uma estação fria como o inverno que é a estação de maior incidência de rotavírus nos climas temperados (BISHOP, 1996a). Isto está de acordo com relatos prévios que afirmam não existir padrão sazonal para as infecções por rotavírus em climas tropicais (LINHARES et al., 1989; COOK et al., 1990).

6.3 Comparação entre as metodologias de ELISA e RT-PCR para detecção do RVC

JIANG et al., 1995 mostraram que o insucesso para detectar o RVC no passado foi devido à infreqüência com a qual métodos de detecção específicos eram utilizados, à falta de sensibilidade, e a baixos títulos de vírus presentes nas amostras fecais. Em vista disso, métodos adequados com alto grau de sensibilidade e especificidade são necessários para a detecção destes agentes. Os métodos de ELISA com anti-soros para linhagens humanas parecem ter sensibilidade adequada para a detecção do RVC e vêm sendo, atualmente, analisados. Entretanto, os métodos de ELISA baseados em reagentes provenientes de linhagens animais, parecem subestimar as verdadeiras taxas de detecção do RVC, uma vez que alguns estudos têm mostrado que o RVC porcino Cowden, o qual parece ter uma única linhagem globalmente distribuída, é distinto do RVC humano (GRICE et al., 1994; JIANG et al., 1996), para o qual sugere-se haver uma variedade de linhagens adaptadas ao hospedeiro humano (PENARANDA et al., 1989). Isto poderia levar a resultados falso negativos em um certo número de amostras, como observado por JIANG et al., 1995 em cujo estudo, o método de ELISA baseado em anti-soro hiperimune policlonal da linhagem porcina falhou em detectar 13 amostras que foram positivas para RVC por RT-PCR. Em outro trabalho, conduzido por SOUZA et al., 1998 duas amostras que foram positivas para rotavírus por ME não reagiram com anti-soro policlonal produzido em coelhos. Em vista disso, é de grande importância a combinação de metodologias sensíveis no diagnóstico do RVC (JIANG et al., 1995; SOUZA et al., 1998; JAMES et al., 1998; ALFIERI et al., 1999). Desta forma, visto que 72 amostras de fezes, testadas no CDC, foram positivas para RVC pelo método de ELISA, a confirmação destes resultados por uma outra metodologia foi necessária. Deste modo, as 83 amostras testadas no CDC, por ELISA sanduíche de captura bilateral, foram enviadas ao LVA para a realização dos testes de RT-PCR para o gene 5 do RVC. A comparação entre as duas metodologias de

detecção de RVC foi um dos objetivos deste trabalho, cujos resultados puderam ser visualizados na figura 16. Setenta e duas amostras foram positivas para RVC pelo método de ELISA, enquanto que pelo método do RT-PCR, 52 foram positivas. O método de ELISA detectou RVC em 20 amostras a mais do que o método do RT-PCR, porém esta diferença não foi significativa pelo teste do X^2 , indicando que ambos os métodos possuem sensibilidade e especificidade equivalentes para detecção de RVC em amostras clínicas, conforme relatos prévios da literatura (FUJII et al., 1992; JAMES et al., 1998; KUZUYA et al., 1998; CASTELLO et al., 2000). Outros autores, entretanto, consideram que o método de escolha é o RT-PCR devido a sua maior sensibilidade (GOUVEA et al., 1991; JIANG et al., 1995). Contudo, os resultados obtidos no presente trabalho, embora não estatisticamente significantes, contradiz tal afirmação. Isto pode ser explicado por uma das duas seguintes razões:

- 1) No início do projeto deste trabalho, todas as 153 amostras de fezes foram diluídas em tampão salina fosfato e estocadas a -85°C , na forma de suspensões fecais a 10% para a utilização posterior para a extração dos RNAs virais. Embora esta seja uma prática comum (GOUVEA et al., 1991), foi observado que pode ocorrer degradação não somente do capsídeo viral, mas também do genoma dos rotavírus em suspensões fecais diluídas, por análise de PAGE (GOUVEA, et al., 1991). Ainda, SAN JUAN et al. (1986) demonstrou que os segmentos de RNA de rotavírus bovino diminuem de intensidade no PAGE quando homogenatos de fezes clarificadas foram mantidos a -20°C por 6 meses. A estocagem das amostras de fezes em seu estado natural tem sido sugerida para a boa preservação viral (GOUVEA et al., 1991) uma vez que, segundo FU et al., 1989, embora as fezes contenham proteases e nucleases de diversas fontes, os rotavírus têm capacidade para persistir neste meio. Além disso, a fezes diarréicas parecem conter substâncias protetoras para as proteínas e o ácido nucléico viral (RAMOS et al., 2000). Foi também demonstrado o efeito protetor das fezes na infectividade dos rotavírus por PESARO et al. (1995). Em adição, como já mencionado anteriormente, as extrações dos RNAs virais foram realizadas anteriormente ao início das reações de PCR. Com o surgimento dos problemas de resultados falso-positivos dos controles negativos, as investigações para eliminar tais problemas demandaram uma grande quantidade de tempo, durante o qual, os RNAs das amostras anteriormente processadas ou, daquelas processadas nos intervalos de tempo em que os controles negativos estavam adequados e, inesperadamente, os mesmos voltavam a apresentar resultado positivo, ficaram armazenados já ressuspensos em água, inicialmente a -20°C e posteriormente, a -85°C , para futura repetição das reações de PCR. Algumas amostras foram submetidas a repetições em baterias, as quais,

inafortunadamente, também apresentaram controle negativo com resultado positivo. Este fato, obrigatoriamente, invalidou tais repetições exigindo uma confirmação adicional, de forma que, algumas amostras chegaram a ser processadas 4 vezes. Tal processo exigiu o descongelamento e posterior congelamento dos RNAs virais ressuspensos em água, o que, diminui a estabilidade dos mesmos, tornando-os passíveis de degradação, embora um estudo tenha mostrado que a infectividade do rotavírus símio (SA-11) em cultura de células seja relativamente estável a repetidos ciclos de congelamento e descongelamento (ESTES, 1996b). Em vista disso, a possibilidade de que alguns dos resultados negativos, obtidos por RT-PCR nas amostras clínicas possa ser devido à degradação dos RNAs virais durante o processamento das mesmas, não pode ser descartada. Outra questão, é que as amostras de fezes foram mantidas congeladas durante uma média de 15 anos, e o número de vezes o qual, tais amostras possam ter sido descongeladas, seja para o processamento de análises anteriores, seja durante os transportes a que foram submetidas desde a sua origem, é desconhecido. Até onde chega o nosso entendimento, não existem relatos sobre a estabilidade dos RVC em amostras de fezes congeladas por este período.

2) Outra explicação plausível para a diferença de detecção obtida entre as duas metodologias é que, embora remota - porque as amostras do atual trabalho foram selecionadas das amostras negativas para RVA previamente testadas por ELISA baseado em anticorpos policlonais e monoclonais (LINHARES et al., 1989) - a chance de algumas destas amostras serem positivas para alguma linhagem mutante de RVA, que possui epítipo idêntico ao que é detectado pelo ELISA para RVC, não pode ser descartada, uma vez que, existe um epítipo comum na proteína VP6 dos rotavírus dos grupos A e C (TSUNEMITSU et al., 1992b). Além disso, em testes de imunofluorescência (IFA) ocorreram casos minoritários de reações cruzadas entre rotavírus dos grupos A e C (TSUNEMITSU et al., 1991), sendo que, tais reações foram confirmadas de serem específicas, após a produção e caracterização de um anticorpo monoclonal que reage com ambos os grupos de rotavírus (TSUNEMITSU et al., 1992b). Estes anticorpos monoclonais reconhecem a VP6 do RVA e 41-kDa (parte da proteína VP6) dos RVC (BREMONT et al., 1988; JIANG et al., 1990). Este fato, também é consistente para explicar o resultado obtido em uma das 83 amostras provenientes de 30 crianças (amostra ID. Nº 24002-75), o qual foi designado como indeterminado por RT-PCR, uma vez que apresentou três bandas inespecíficas ao invés de uma única banda do tamanho de 267pb. Esta mesma amostra, entretanto, apresentou resultado de ELISA positivo para antígeno de grupo VP6 do RVC.

Ademais, embora TSUNEMITSU et al. (1992b), autores do teste de ELISA utilizado nas amostras deste trabalho, afirmem que não ocorreram casos de reações cruzadas nos testes realizados, o número de amostras testadas, para embasar tal afirmação, foi de 6 amostras positivas para rotavírus dos grupos A e B e negativas para RVC. A probabilidade casuística de que este fato possa ocorrer em 83 amostras é maior do que aquela em 6 amostras. Além disso, para minimizar reações inespecíficas nos testes de ELISA geralmente utilizam-se anticorpos produzidos por duas espécies de animais diferentes: uma para produzir o anti-soro de captura de antígeno, outra para produzir o anti-soro do qual será extraída a imunoglobulina detectora de antígeno (JAMES et al., 1998). No teste de ELISA utilizado para a detecção do RVC nestas amostras, ambos os anti-soros foram produzidos em porcos, embora o anti-soro de captura tenha sido produzido a partir de um *pool* de soros de porcos e bezerros (TSUNEMITSU et al., 1992b). Em outro teste de ELISA para detecção de antígeno de grupo específico do RVC, baseado em reagentes derivados VP6 recombinante, de linhagens humanas, desenvolvido por JAMES et al. (1998), foram observados, nos experimentos iniciais de determinação de critério para positividade, um valor alto de $A_{450\text{ nm}}$ para uma amostra positiva para rotavírus do grupo A. Outra amostra contendo vírus SRSVs foi também positiva por ELISA para rotavírus do grupo C, mas negativa para RT-PCR (gene 5). Assumindo que o RT-PCR é o "padrão ouro" para detecção do RVC (embora não tenha sido utilizado um controle interno no PCR, existindo, assim a possibilidade de que estas fezes contivessem inibidores), a especificidade do ELISA poderia ser melhorada por redefinição do *cutoff* limite, embora isto resulte em perda da sensibilidade (JAMES et al., 1998).

A combinação do ELISA, como método rápido de rastreamento, com a confirmação por RT-PCR provou ser efetiva para detecção do RVC, conforme relatos prévios (JIANG et al., 1995; JAMES et al., 1998). Para reduzir os casos de resultados falso-positivos, a especificidade do ELISA poderá ser aumentada, no futuro, pelo uso de anticorpos monoclonais para a proteína do capsídeo interno (JAMES et al., 1998).

6.4 Análise dos sintomas clínicos associados ao RVC, e do perfil de excreção dos mesmos em uma criança acompanhada quinzenalmente

Os dados da história clínica de 14 crianças com episódios de diarreia foram também analisados neste trabalho. Os 29 episódios de diarreia (embora houvesse 32 amostras diarreicas, somente 29 possuíam prontuários disponíveis) e os sintomas clínicos associados aos mesmos puderam ser observados na Tabela 8. Os sintomas clínicos analisados foram N° de evacuações/dia, vômitos, febre, anorexia, dor abdominal, indisposição geral, sintomas respiratórios, além da presença de outros enteropatógenos e da amamentação. O RVC foi detectado por RT-PCR em 17 dos episódios de diarreia analisados. Entretanto, as proporções dos sintomas encontrados em tais episódios, não foram estatisticamente diferentes das proporções dos sintomas encontrados nos episódios de diarreia causados por outros enteropatógenos. Além disso, nos 17 episódios onde o RVC estava presente, 13 estavam também associados com outros agentes causadores de gastroenterites (Tabela 9), de modo que, não foi possível definir se a diarreia foi causada pelo RVC ou por outros agentes ou ainda, pela associação de ambos. Em outros estudos realizados por JIANG et al. (1995) em 15 crianças de até 2 anos, e por NILSSON et al. (2000) em 8 adultos, as porcentagens observadas em cada sintoma, em relação ao total de amostras positivas para RVC, de cada sintoma observadas nas crianças do presente estudo, foram menores com exceção da febre. A saber: 29% de vômitos foram relatados nas crianças do presente estudo, contra 88% em crianças até 2 anos e 75% em adultos; 59% de febre estava presente nas crianças deste estudo, contra 25% nos adultos; o N° médio de evacuações/dia nas crianças do presente estudo foi 4,3, contra 5 em crianças até 2 anos, e 7 em adultos; 41% de dor abdominal foi observada nas crianças deste estudo, contra 75% em adultos; e 88% das crianças do presente estudo tinham outros enteropatógenos presentes, contra 38% dos adultos e 0% em crianças até 2 anos. Em outro estudo realizado por HAMANO et al. (1999), em crianças de 6 a 12 anos afetadas por diarreia causada por RVC em um surto ocorrido no Japão, as porcentagens de sintomas encontradas foram semelhantes as encontradas nas amostras de Belém, como segue: vômitos 57%, febre 42% e dor abdominal 45%. Os resultados encontrados no presente trabalho, em conjunto com os de relatos prévios, sustentam que a severidade da diarreia e a desidratação clínica causadas pelo RVC são menos severas do que aquelas encontradas nas infecções causadas por RVA (ISHIMARU et al., 1990; FUJITA et al., 1994; GABBAY et al., 1999; NILSSON et al., 2000b), independentemente da faixa etária atingida. Contudo, CASTELLO et al., 2000 relatou que os

sintomas clínicos associados às infecções causadas por RVC e por RVA, na Argentina, em termos de severidade de diarreia, vômitos e de desidratação clínica, não apresentaram diferenças.

A presença de sintomas respiratórios em metade dos episódios de diarreia com os RVC presente nas fezes, embora não tenha sido estatisticamente diferente da proporção encontrada nos episódios cujas fezes foram negativas por RT-PCR, está de acordo com outros relatos que têm observado a associação de tais sintomas com os rotavírus (SANTOS et al., 1983; FRANGOSO et al., 1986; ZHENG et al., 1991a, GOLDWATER et al., 1979).

Entre os dados que estavam disponíveis nos 29 prontuários médicos analisados, estavam o N° e a ordem dos episódios de diarreia, uma vez que, tais prontuários referiam-se tanto a infecções primárias quanto a reinfecções. VELAZQUEZ et al. (1996) sugerem que as infecções causadas pelo RVC são mais virulentas quando primárias. Este dado, entretanto, não pôde ser avaliado no presente trabalho devido a que, somente 2 crianças (ID N° 24415 e 24006), das 14 que apresentaram episódios de diarreia, possuíam as amostras da infecção primária sintomática e uma ou mais amostras referentes a reinfecções. Porém, em ambas crianças, os sintomas clínicos observados no primeiro episódio de diarreia foram, de fato, mais severos ou mais freqüentes do que aqueles do que aqueles relatados nos episódios subseqüentes (Tabela 8).

O efeito da amamentação em relação à infecção por RVC foi também analisado neste trabalho, embora o número de crianças que estavam sendo amamentadas fosse pequeno (5). Estudos epidemiológicos de diarreia e amamentação têm mostrado que os lactentes que são amamentados com leite materno apresentam uma incidência menor de diarreia do que os lactentes que não o são (FEACHEM E KOBLINSKY, 1984; PICKERING E KOHL, 1986) tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento (GOLDING et al., 1997). Entretanto, os relatos sobre o efeito protetor do leite materno contra a diarreia causada por rotavírus têm demonstrado resultados variáveis (ZHENG et al., 1991b; BELL et al., 1988; GUNNLAUGSSON et al., 1989; GLASS et al., 1986; WEINBERG et al., 1984; CLEMENS et al., 1993). No presente estudo, não foi possível demonstrar o efeito protetor do leite materno, uma vez que não foram encontradas associações entre a amamentação e a taxa de incidência de RVC.

A freqüência temporal da presença do RVC nas amostras de fezes coletadas quinzenalmente, de uma mesma criança (ID N°24006), desde o seu nascimento até os três anos de idade, foi evidenciado na figura 17. Foi demonstrado, desde o primeiro mês de idade

desta criança, um perfil de excreção constante do RVC, com intervalos curtos de ausência de liberação dos mesmos. O perfil observado caracterizou a ocorrência de uma infecção crônica por RVC, com reativações sintomáticas esporádicas, ou, um caso seqüencial de reinfecções múltiplas causadas por RVC, para o qual, não há relatos prévios na literatura científica. Numerosos estudos descrevem, entretanto, altas taxas de reinfecção com RVA, especialmente em países em desenvolvimento (MATA et al., 1983; GRINSTEIN et al., 1989; LINHARES et al., 1988; REVES et al., 1989; BERNSTEIN et al., 1991).

Alguns destes estudos têm relatado reinfecções pelo mesmo sorotipo que causou a infecção original (REVES et al., 1989; BERNSTEIN et al., 1991). Embora investigações prévias em todo o mundo, têm indicado que a infecção natural por rotavírus oferece, pelo menos, proteção parcial contra a doença subsequente, a duração daquela não é claramente estabelecida (WARD E BERNSTEIN, 1994). Além disso, o grau de proteção pode variar da proteção total por pelo menos 2 anos (BERNSTEIN et al., 1991), a proteção limitada, e a doença seqüencial múltipla por rotavírus (MATA et al., 1983). A doença seqüencial causada por um mesmo sorotipo de rotavírus foi anteriormente descrita por CHIBA et al., 1986; REVES et al., 1989; DeCHAMPS et al., 1991; MATSON et al., 1993 e WARD E BERNSTEIN, 1994. Em um destes estudos, as linhagens de RVA responsáveis pela doença seqüencial, foram ambas do sorotipo 1, porém com eletroferotipos distintos (WARD E BERNSTEIN, 1994). Há evidências conflitantes quanto a proteção sorotipo-específica (CHIBA et al., 1986; WARD et al., 1992). Um estudo realizado nos EUA, investigando a proteção contra as reinfecções causadas por RVA, das 37 crianças que apresentaram infecção assintomática no primeiro ano do estudo, nenhuma delas desenvolveu doença por rotavírus no segundo ano (WARD E BERNSTEIN., 1994). No mesmo estudo, tanto os indivíduos que desenvolveram infecção sintomática quanto assintomática por rotavírus foram altamente protegidos contra infecções subsequentes. Estudos realizados em outras localizações geográficas, entretanto, têm demonstrado que a doença seqüencial por rotavírus parece ser comum (MATA et al., 1983; CHIBA et al., 1986; REVES et al., 1989; DeCHAMPS et al., 1991; MATSON et al., 1993 e WARD E BERNSTEIN, 1994; BISHOP et al., 1983; FRIEDMAN et al., 1988; COULSON et al., 1992). É difícil conciliar estes resultados aparentemente conflitantes (WARD E BERNSTEIN, 1994), porém, possivelmente, exista uma maior similaridade genética entre as linhagens circulantes em cujos estudos encontraram maior proteção, do que naquelas cujos estudos demonstram menor proteção. Também é possível que aquelas linhagens sejam melhores imunógenos do que as linhagens que permitam doença seqüencial causada por rotavírus (WARD E BERNSTEIN, 1994). Embora

tenha-se relatado que níveis de IgA rotavírus-específica fecal, salivar e sérica, níveis de IgG sérica tipo-específico, e a imunidade mediada por células reflitam a infecção natural e a doença por rotavírus, e que, a resposta humoral na primeira infecção seja primariamente homotípica (para o sorotipo G infectante) enquanto a resposta humoral nas infecções subseqüentes seja ampla e reflitam uma resposta heteróloga, os componentes necessários para a resposta imune contra o RVC não foram ainda completamente definidos. Em adição, outros estudos sugerem que, no caso da diarréia persistente, esta é uma entidade clínica e a mesma pode estar mais relacionada às experiências de saúde das crianças e às condições do ambiente doméstico, do que a um patógeno entérico particular (FRASER et al., 1998). Desta forma, estudos epidêmico-imunológicos adicionais são necessários para que se possa explicar o perfil de liberação de RVC encontrado neste estudo.

Contudo, deve-se considerar, ainda, a possibilidade de ter ocorrido resultados falso-negativos nas amostras da criança ID. Nº 24006, devido a falhas nos procedimentos técnicos, já discutidos previamente, o que explicaria os períodos de ausência de liberação de RVC, e, se este fosse o caso, caracterizaria, mais provavelmente um caso de infecção crônica do que um caso de reinfeção seqüencial por RVC.

O perfil de liberação do RVC observado nas amostras quinzenais da criança ID. Nº 24006, aliado ao achado de que 77 amostras (de 30 crianças) positivas por RT-PCR (gene 5) para RVC eram assintomáticas, sugerem que estes agentes podem ser endêmicos, causando infecções inaparentes, na região de Belém do Pará. Especialmente na área suburbana, onde as condições de saneamento básico são precárias. Deve-se aliar a este fator, outros como: os períodos prolongados de liberação (AHMED E STEVENS, 1990) de altas taxas de partículas virais nas fezes de indivíduos infectados por rotavírus, o alto potencial infectante dos mesmos (BISHOP, 1996a), a resistência ao calor e a agentes químicos (STEELE, 1999; RAMOS et al., 2000), e a estabilidade dos rotavírus tanto em superfícies (SATTAR et al., 1994) quanto em águas no meio ambiente (HURST E GERBA, 1980; RAPHAEL et al., 1985; PANCORPO et al., 1987; ANSARI et al., 1991). Além disso, a transmissão e a preservação destes vírus são favorecidas pelos seguintes fatores: as condições fisiológicas e imunológicas do hospedeiro, a existência das infecções sub-clínicas e dos portadores saudáveis, a transmissão fecal-oral, e o curto período de incubação (RAMOS et al., 2000). Contudo, em um estudo realizado na região suburbana de Buenos Aires, na Argentina, os RVCs foram detectados por RT-PCR (gene 5) exclusivamente em crianças diarreicas, sendo que nenhuma das crianças saudáveis testadas apresentaram RVC nas fezes (CASTELLO et al., 2000). Entretanto, a região onde foi realizado

este último estudo possui um clima totalmente distinto daquele encontrado no norte do Brasil e, conforme relatos prévios, o clima e a umidade exercem influência na manutenção da infectividade em condições naturais (RAMOS et al., 2000) e na sazonalidade, das infecções causadas por rotavírus (CDC, 1997; COOK et al., 1990; KOOPMANS E BROWN, 1999). Em adição, COOK et al. (1990), sugerem que as diferenças no padrão sazonal em climas tropicais e temperados pode apontar para diferenças nos padrões de transmissão e talvez, para diferenças no reservatório da infecção.

As características clínicas das reinfecções na criança ID Nº 24006 puderam ser também analisadas, com exceção de três dos episódios de diarreia (o segundo, o sétimo e o nono). A sintomatologia relatada na infecção primária foi mais severa do que nas infecções subseqüentes. O primeiro episódio de diarreia foi caracterizado por todos os sintomas clínicos relacionados às infecções por RVC, segundo a literatura (MACKOW, 1995; JIANG et al., 1995; GABBAY et al., 1999; CASTELLO et al., 2000; NILSSON et al., 2000b), com exceção da dor abdominal. Os episódios subseqüentes, foram progressivamente mais suaves, possivelmente em decorrência da imunidade parcial adquirida. Embora o quinto episódio tenha sido caracterizado somente por indisposição geral e diarreia, o sexto episódio apresentou todos os sintomas relacionados às gastroenterites, porém, neste episódio foi pela primeira vez relatada a presença concomitante de outros enteropatógenos, o que sugere que os mesmos tenham sido responsáveis pela sintomatologia apresentada.

A história clínica dos pacientes com diarreia devido ao RVC, na região de Belém do Pará, analisados neste estudo, sugerem que, na região norte do Brasil, as infecções causadas por rotavírus do grupo C são mais brandas do que aquelas causadas por RVA. Tais achados corroboram os relatos prévios da literatura, obtidos em outras localizações geográficas (ISHIMARU et al., 1990; JIANG et al., 1995; JAMES et al., 1997; FUJITA et al., 1998; NILSSON et al., 2000b), exceto por um relato que sugere que as infecções por RVC são mais severas que aquelas causadas por RVA (GRICE et al., 1994).

6.5 Análises envolvendo enzimas de restrição (PCR-RFLP)

Com o objetivo de encontrar variabilidades genéticas nas linhagens virais dos RVC, detectados em amostras clínicas de moradores da região suburbana de Belém, foram escolhidos os produtos amplificados do *nested* PCR de 16 amostras positivas e, de uma amostra indeterminada para serem digeridos com as enzimas de restrição AluI, BglII, MboI e

XbaI (GibcoBRL®). O número de amostras a serem digeridas foi determinado pela quantidade de enzimas disponível no laboratório. O controle positivo Cowden foi também analisado, para ser usado como parâmetro de comparação entre os perfis de digestão encontrados nas amostras clínicas.

Para escolher as amostras a serem digeridas entre as 52 com resultado positivo (do grupo de 83 amostras de 30 crianças), foi estabelecido a condição de que o produto amplificado de 267 pb, observado após eletroforese, deveria ter apresentado uma banda de forte intensidade, para garantir quantidade suficiente de produto capaz de produzir, posteriormente, bandas digeridas de fácil visualização. As amostras que obedeceram a esta condição foram divididas em grupos segundo as variáveis idade, tipo de fezes, e a estação do ano em que a coleta foi realizada. Esta divisão foi efetuada, exclusivamente, com o objetivo de aumentar a probabilidade de encontrar as diferenças genômicas, não visou, portanto, analisar associações entre os perfis encontrados e os grupos de variáveis nos quais estavam enquadrados. De cada categoria, foram escolhidas aleatoriamente, 2 amostras. Como poderia haver justaposição de amostras que se enquadravam em mais do que uma categoria, as amostras foram enquadradas dentro de apenas uma categoria. Devido às condições impostas para a escolha ou exclusão das amostras, somente uma amostra da categoria da "verão", preenchia a todos os critérios de escolha. Uma exceção foi feita em relação ao critério "amostras positivas para o gene 5 do RVC". Assim, a amostra que apresentou 3 bandas inespecíficas, com o resultado "indeterminado" foi incluída para análise de RFLP dentro da categoria "25 a 36 meses". Os resultados das digestões com as diferentes enzimas foram apresentados nas figuras 18 -21.

Os perfis de restrição encontrados para a linhagem Cowden (controle positivo) com as enzimas Mbo I, Xba I e Alu I estão de acordo com relatos prévios da literatura (RIPENHOFF-TALTY et al., 1996). Os mesmos perfis, para cada uma das enzimas, foram observados em 14 das amostras clínicas analisadas, indicando que, no segmento genômico que estava sendo analisado (uma região parcial do gene 5 do RVC) não há diferenças genéticas, entre a linhagem que infecta humanos e a que infecta suínos.

Nos testes preliminares das digestões com a enzima Bgl II foram observadas diversas bandas de digestão parcial. Por esta razão, as digestões dos produtos amplificados, tanto no controle quanto das amostras clínicas, foram realizadas com o dobro da concentração de enzima recomendada pelo fabricante, o que, segundo SWAMINATHAN & MATAR (1993), pode eliminar o efeito inibitório de contaminantes (proteínas, polissacarídeos, fenol, clorofórmio, etanol, EDTA, SDS, e concentração inadequada de sais) responsáveis por digestões parciais.

Ainda assim, este problema não pôde ser evitado. Contudo, se os produtos amplificados apresentavam inibidores presentes, estes possivelmente, encontravam-se em baixas concentrações, uma vez que, as mesmas amostras foram utilizadas para a digestão com as outras três enzimas, onde este problema não foi apresentado. Dentre as bandas de intensidades semelhantes, observadas após a digestão com Bgl II, observou-se as bandas de tamanho 104 e 162pb, as quais eram esperadas, segundo a literatura (RIPENHOFF-TALTY et al., 1996). Os tamanhos derivados das demais bandas foram também apresentados, os quais foram obtidos através da análise com o programa Electrophoresis Documentation and Analysis System 120, contudo, como as digestões permaneceram parciais, não foi possível calcular, com precisão, o tamanho molecular de tais bandas. Ainda assim, a observação da presença de amostras com perfil distinto daquele obtido com o Cowden, foi possível.

Uma amostra (ID N°23996-60) apresentou perfil diferente daquele obtido para o Cowden, somente na digestão com a enzima Alu I. Isto sugere a ocorrência de um rearranjo no sítio de reconhecimento desta enzima (SWAMINATHAN, B. & MATAR, G.M., 1993).

Duas das amostras clínicas analisadas (ID N°24002-75 e 24233-73) apresentaram, com todas as enzimas utilizadas, bandas adicionais de restrição, revelando um perfil diferente das demais amostras, bem como do controle Cowden. Uma destas amostras (ID N°24002-75) apresentou resultado indeterminado por RT-PCR, indicando uma das duas possibilidades:

1) Trata-se de uma outra espécie ou outro grupo de rotavírus, visto que a mesma obteve resultado positivo no teste de ELISA para RVC.

2) O achado de que esta amostra produziu, após a reação de *nested* PCR com os iniciadores para o gene 5, não um segmento de 267pb, mas sim segmentos de tamanhos maiores, sendo a de intensidade mais forte de 674pb, sugere uma remota possibilidade, de que esta seja uma linhagem originada de rearranjo gênico, onde teria ocorrido uma duplicação da ORF (região de leitura aberta do gene) com extensão na terminação 3' (região de anelamento dos iniciadores C4 e C3 [GOUVEA et al., 1991]). Tal duplicação tem sido o mecanismo mais comum de reorganização em rotavírus (DESSELBERGER, 1996). Contudo, não há relatos prévios para a ocorrência de reorganização gênica em RVC. Para tal confirmação, entretanto, seria necessário realizar o seqüenciamento de DNA, da amostra em questão, o que não foi possível realizar no presente trabalho, embora uma tentativa tenha sido feita (dados não mostrados).

A segunda amostra (ID N°24233-73) que apresentou um perfil distinto daquele encontrado para o Cowden, em todas as enzimas utilizadas, sugere que a diversidade seja

atribuída à presença de uma linhagem diferente de RVC e/ou que tenha ocorrido uma ou mais mutações pontuais no segmento gênico analisado (DUBOIS et al., 1997). Um estudo revelou que a taxa de mutação de rotavírus porcino é de aproximadamente 10^{-5} mutações/nucleotídeo/replicação (BLACKHALL et al., 1996). Esta taxa de mutação sugere que a média de diferenças entre o genoma de rotavírus da progênie e o genoma do rotavírus parental é de pelo menos uma mutação, o que é consistente com a alta taxa de mutações esperada, uma vez que os rotavírus são caracterizados por um alto grau de diversidade genética (RAMIG, 1997). A comparação da seqüência de nucleotídeos do gene 5 entre as linhagens humanas do grupo C isolada de Belém e a linhagem Bristol, revelou 28 trocas de bases, das quais 25 ocorreram dentro da região codificadora. Em contraste, a comparação da seqüência de nucleotídeos do gene 5 do Cowden e da linhagem humana do grupo C de Belém revelou 226 mudanças de bases totais. Marcadamente cada uma das 25 mudanças entre as seqüências codificadoras da VP6 humanas foram mutações silenciosas, que não alteraram a seqüência derivada da proteína VP6 (COOK et al., 1992).

Foi também realizado digestões dos produtos do PCR *nested* de 21 amostras da criança Nº24006 com a enzima Xba I. A escolha das amostras foi baseada na distribuição mensal *versus* a positividade. Assim, uma amostra de cada mês foi selecionada para a análise por digestão com Xba I, desde que houvesse pelo menos um caso positivo em cada um dos meses dos anos de 1983, 1984 e 1985 e, também, que o produto do nested PCR visualizado após eletroforese, apresentasse uma banda de forte intensidade. Deste modo, não houve amostras adequadas para a análise nos meses de: julho e outubro de 1983; fevereiro, maio, julho, setembro e novembro de 1984; e fevereiro, março, abril, maio, julho, agosto, setembro e dezembro de 1985. Os perfis de restrição das amostras foram comparados com o perfil obtido para o Cowden. Os perfis das amostras de todos os meses analisados foram iguais aos do controle Cowden. (Fig. 22). Isto mostra que não ocorreram mutações genéticas no segmento gênico que estava sendo analisado, em nenhum dos diferentes meses em que o RVC estava presente nas fezes desta criança. Estes dados sugerem que este paciente poderia estar sendo constantemente infectado por uma mesma fonte contaminada com RVC, talvez, a água. A provável condição nutricional e sócio-econômica precária deve ter contribuído para uma resposta imunológica deficiente neste paciente que impediu sua proteção para infecções subseqüentes com a mesma cepa viral. O perfil idêntico ao do Cowden que foi observado em todas as amostras analisadas por PCR-RFLP, sugerem ainda, que outra possível fonte de contaminação possa ser os porcos, os quais eram criados na região onde o estudo foi

realizado. Para concretizar tal hipótese, análises adicionais se fazem necessárias, visto que a enzima de restrição utilizada é limitada à detecção de variações em seu sítio de clivagem. Contudo, há evidências convincentes de que a transmissão de rotavíruses de animais para humanos possa ocorrer (NAKAGOMI E NAKAGOMI, 1993). Além disso, o contato íntimo que é comum entre crianças pequenas e animais domésticos poderia potencializar este intercâmbio, e este fato tem sido identificado como um fator de risco para a diarreia por rotavírus em alguns locais (ENGLEBERG et al., 1982). Dados atuais suportam a crença de que a transmissão interespecies dos vírus, sejam eles reorganizados geneticamente ou não, podem ser responsáveis por diarreia severa em lactentes, mas é improvável que tais linhagens tenham a capacidade de causar surtos significativos de doença. Linhagens de genoma reorganizado entre genogrupos humanos podem ocorrer mais freqüentemente do que é detectado, e pode algumas vezes, resultar em linhagens hábeis em causar surtos epidemiologicamente importantes (BISHOP, 1996a).

A identidade das linhagens com perfis distintos de PCR-RFLP poderiam ser estabelecidas por seqüenciamento e/ou estudo de outro gene, ou ainda por comparação dos fragmentos de restrição com aqueles obtidos de seqüências deduzidas em bancos de dados (GenBank, por exemplo) (DUBOIS, et al., 1997). Entretanto, não era o objetivo deste trabalho caracterizar, mas apenas identificar a ocorrência de diversidade entre as linhagens do RVC. Desta forma o PCR-RFLP mostrou ser uma poderosa ferramenta para a avaliação de diversidade de linhagens virais (DUBOIS, et al., 1997).

7. Conclusões

- ✓ A técnica de RT-PCR é eficaz para a detecção do RVC em amostras clínicas. Porém, a possibilidade de gerar resultados falso-positivos, em vista da sua extraordinária sensibilidade, exige cuidados extremos na sua realização para a obtenção de resultados seguros.

- ✓ O método de RT-PCR possui sensibilidade e especificidade equivalentes ao do ELISA sanduíche para detecção de antígeno de grupo VP6 para detecção dos RVC isolados a partir de amostras clínicas.

- ✓ Na região de Belém do Pará, tanto a frequência quanto a severidade da diarreia, e a desidratação clínica causadas pelo RVC são menores do que a frequência e a severidade das gastroenterites causadas pelo rotavírus do grupo A.

- ✓ O RVC pode ser frequentemente encontrado em amostras de fezes de pacientes assintomáticos e associado a casos esporádicos de gastroenterites. Entretanto, as reinfecções e/ou as infecções crônicas são comuns no local onde o estudo foi realizado.

- ✓ Na região suburbana de Belém, 10 em cada 100 crianças, de 0 a 36 meses de idade corriam o risco de serem infectadas; destas 5 desenvolveriam diarreia, no mínimo uma vez, causada pelo RVC.

- ✓ O perfil de excreção constante de RVC, com intervalos curtos de ausência de liberação dos mesmos, foi demonstrado desde o primeiro mês de idade de uma criança da região analisada. O perfil observado caracterizou um caso seqüencial de reinfecções múltiplas causadas pelo RVC ou um caso de infecção crônica pelo RVC.

- ✓ A análise de PCR-RFLP das amostras mensais de um mesmo hospedeiro sugere que esse paciente poderia estar sendo constantemente infectado por uma mesma fonte de RVC e, ainda, que esta contaminação possa ter sido fruto de uma transmissão interespecie.

- ✓ O perfil de liberação do RVC observado nas amostras quinzenais de uma mesma criança e o número de amostras positivas de pacientes assintomáticos, detectadas por RT-PCR (gene 5) para rotavírus do grupo C assintomáticas, sugerem que estes agentes podem ser endêmicos, causando infecções inaparentes, na região de Belém do Pará.

- ✓ A técnica de PCR-RFLP demonstrou ser capaz de detectar diversidade de linhagens virais.

- ✓ A incidência de RVC em crianças de Belém do Pará, demonstrada pela utilização da técnica de RT-PCR, revelou que o RVC colabora para a morbidade infantil, na região estudada.

8. PERSPECTIVAS DO TRABALHO

Para uma maior segurança dos resultados aqui apresentados, as amostras consideradas positivas para RVC, analisadas neste trabalho através de RT-PCR utilizando iniciadores para o gene 5, poderão ainda, ser reanalisadas por RT-PCR com a utilização de iniciadores que anelem em outras regiões gênicas dos RVC, o gene 6 por exemplo. Estas análises adicionais confirmariam os resultados obtidos no presente trabalho, eliminando qualquer possibilidade de resultados positivos decorrentes de DNA contaminante (*carry-over*).

A identidade das linhagens de RVC com perfis distintos de PCR-RFLP, encontradas neste trabalho, poderão ser analisadas por seqüenciamento genético ou por comparação dos fragmentos de restrição obtidos com as enzimas utilizadas neste trabalho com seqüências já depositadas nos bancos de dados. As informações assim adquiridas, além de propiciarem a identificação de novas cepas de RVC, seriam também de extrema utilidade em estudos posteriores, que busquem o entendimento dos mecanismos de defesa imunológica dos indivíduos infectados pelo RVC. Desta forma, poder-se-ia encontrar explicações para a alta freqüência de reinfecções ou de infecções crônicas causadas pelo RVC, em crianças com menos de três anos, conforme demonstrado neste trabalho. Este estudo complementar também permitiria a diferenciação entre esses dois eventos. Tais informações seriam igualmente úteis para estabelecer a eficácia das vacinas dirigidas contra este patógeno.

Investigações futuras sobre os RVC devem focalizar populações cujas características sócio-econômicas sejam precárias, já que tal enfoque, possivelmente, aumentaria as chances de contato com fontes de contaminação, muitas vezes, desconhecidas. A real importância sobre a transmissão do RVC por animais não é suficientemente compreendida, especialmente em países em desenvolvimento, necessitando de estudos adicionais. Ademais, o papel da resistência do hospedeiro e os fatores que fazem estes agentes diarréicos serem patogênicos para uns e não para outros, oferece amplo objeto de estudo, envolvendo áreas de pesquisa da imunologia, virologia, epidemiologia e saúde pública.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. – **Cellular and Molecular Immunology**, 4nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. p.343-363.
- ADAMS, W.R.; KRFT, L.M. - Epizootic diarrhea of infant mice: Identification of the etiologic agent. **Science**, 141: 359, 1963.
- AHMED, R.; STEVENS, I.G. - Viral persistence. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, B.N. et al. (Eds) - **Virology**, 2nd ed., vol. 1. New York: Raven Press, 1990. p. 241-265.
- ALFIERI, A.A.; LEITE, J.P.G.; ALFIERI, A.F.; JIANG, B.; GLASS, R.I., GENTSCH, J.R. - Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. **J. Virol. Methods**, 83: 35-43, 1999.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS - Prevention of rotavirus disease: guidelines for use of rotavirus vaccine. **Pediatrics**, 102(6): 1483-1491, 1998.
- ANSARI, S.A.; SPRIGTHORPE, V.S.; SATTAR, S.A. - Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. **Reviews of Infectious Diseases**, 13: 448-461, 1991.
- ARAÚJO, C.L.C.; VANZELLOTTI, I.R.; LEMOS, J.I.; AZEVEDO, M.F. (Trad.) – **Steman Dicionário Médico**. 25^oed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996. p. 662.
- BALL, J.M.; TIAN, P.; ZENG, C.Q.Y.; MORRIS, A.P.; ESTES, M.K. - Age-dependent diarrhea induced by a rotavirus non-structural glycoprotein. **Science**, 272:101-104, 1996.
- BARBETTA, P.A. - **Estatística Aplicada às Ciências Sociais**. 2^o ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 1994. p. 221-242.
- BARLETT, A.V.; MOORE, M.; GARY, G.W.; STARKO, K.M.; ERBEN, J.J.; MEREDITH, B.A.; - Diarrheal illness among infants and toddlers in day care centers. I. **Epidemiology and pathogens**. **J Pediatr.**, 107: 495-502, 1985.
- BARNES, G.L.; UREN, E.; STEVENS, K.B.; BISHOP, R.F. - Etiology of acute gastroenteritis in hospitalized children in Melbourne, Australia, from April 1980 to March 1993. **J. Clin. Microbiol**, 36: 133-8, 1998.
- BASS, D.M.; GREENBERG, H.B. - Group A rotaviruses. In: BLASER, M.J.; SMITH, P.D.; RAVDIN, J.I. et al. (Eds) - **Infections of the Gastrointestinal Tract**. New York: Raven Press, 1995.

- BEHAR, M. - Importancia de la alimentación y la patogenia y prevención de los procesos diarreicos. **Bol. Sanit. Panamer.**, 78 (4): 334-42, 1976.
- BELL, L.M.; CLARK, H.F.; OFFIT, P.A.; SLIGHT, P.H.; ARBETER, A.M.; PLOTKIN, S.A. - Rotavirus serotype-specific neutralizing activity in human milk. **Am. J. Dis. Child**, 142: 275-278, 1988.
- BENKADDOUR, M.; TACHE, S.; LABIE, C.; BODIN, G.; ECKHOUTTE, M. - Influence of temperature, acidity and lactic acid bacteria on the stability of rotavirus and coronavirus in milk. **Rev. Med. Vet. (Toulouse)**, 144: 709-716, 1993.
- BERN, C.; MARTINEZ, J. ; de ZOYSA, I.; GLASS, R.I. - The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten years update. **Bull WHO**, 70: 705-714, 1992.
- BERNSTEIN, D.I.; SANDER, D.S.; SMITH, V.E.; SCHIFF, G.M.; WARD, R.L. - Protection from rotavirus reinfection: 2-year prospective study. **J. Infect. Dis.**, 164: 277-283, 1991.
- BISHOP, R. F.; DAVIDSON G. P.; HOLMES I. H.; RUCK, B.J. - Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **Lancet**, 2: 1281-1283, 1973.
- BISHOP, R.F.; BARNES, G.L.; CIPRIANI, E.; LUND, J.S. - Clinical immunity after neonatal rotavirus infection: a prospective longitudinal study in young children. **N. Engl. J. Med.**, 309: 72-6, 1983.
- BISHOP, R.F. - Natural history of human rotavirus infection. **Arch. Virol**, 12 (suppl): 119, 1996a.
- BISHOP, R.F.; BUGG, H.C.; MASENDYCH, P.J.; LUND, J.S.; GORRELL, R.J.; BARNES, G.L. - Serum, fecal, and breast milk rotavirus antibodies as indices of infection in mother-infant pairs. **J. Infect. Dis.**, 174 (Suppl1): S22-S29, 1996b.
- BLACKHALL, J.; FUENTES, A.; MAGNUSSON, G. - Genetic stability of a porcine rotavirus RNA segment during repeated plaque isolation. **Virology**, 225: 181-190, 1996.
- BOBO, L.; OJEH, C.; CHIU, D.; MACHADO, A.; COLOMBANI, P.; SCHWARZ, K. - Lack of evidence for rotavirus by polymerase chain reaction/Enzyme Immunoassay of Hepatobiliary samples from children with Biliary Atresia. **Pediatr. Res.**, 41(2): 229-234, 1997.
- BONNO, M.; HIGASHIGAWA, M.; NAKANO, I.; MIYAHARA, M.; AZUMA, E.; KOMADA, Y.; ITO, M.; SAKURAI, M. - Acute myositis with transient decrease of albumin, immunoglobulin and complement following rotavirus gastroenteritis. **Acta. Paediatr. Jpn**, 40: 82-84, 1998.
- BOTH, G.W.; BELLAMY, A.R.; MITCHELL, D.B. - Rotavirus Protein Structure and Function. In: Raming, R.F.(Ed.) - **Rotaviruses**. Germany: Springer-Verlag, 1994. p.83.

- BRANDT, C.D.; KIM, H.W.; RODRIGUEZ, W.J.; ARROBIO, J.O.; JEFRIES, B.C.; STALLINGS, E.P.; LEWIS, C.; MILES, A.J.; CHANOK, R.M.; KAPPIKIAN, A.Z.; PARROTT, R.H. - Pediatric viral gastroenteritis during eight years of study. **Journal of Clinical Microbiology**, 18: 71-78, 1983.
- BREMONT, M.; COHEN, J.; McCRAE, E. - Analysis of structural polypeptides of porcine group C rotavirus. **J. Virol.**, 62: 2183-2185, 1988.
- BRIDGER, J.C.; PEDLEY, S.; McCRAE, M.A. - Group C rotaviruses in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, 23: 706-763, 1986.
- BROWN, D.W.G.; MATHAN, M.M.; MATHEW, M.; MARTIN, R.; BEARDS, G.M.; MATHAN, V.I. - Rotavirus epidemiology in Vellore, South India: group, subgroup, serotype, and electropherotype. **Journal of Clinical Microbiology**, 26: 2410-2414, 1988.
- BROWN, D.W.; CAMPBELL, L.; TOMKINS, D.S.; HAMBLING, M.H. - School outbreak of gastroenteritis due to atypical rotavirus. **Lancet**, 23: 737-738, 1989
- BURNS, N.W.; SIADAT-PAJOUH, M.; KRISHNANEY, A.A.; GREENBERG, H.B. - Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. **Science**, 272:104-107, 1996.
- CARDOSO, D.P.C. - **Rotavírus em crianças de Goiânia, Goiás: Caracterização das amostras de rotavírus do grupo A pela sorotipagem, subgrupagem e padrão eletroforético**. 1997 (PhD Thesis - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP)
- CASTELLO, A.A.; ARGÜELLES, M.H.; VILLEGAS, G.A.; LÓPEZ, N.; GHIRINGHELLI, P.; SEMORILE, L.; GLIKMANN, G. - Characterization of Human group C rotavirus in Argentina. **Journal of Medical Virology**, 62: 199-207, 2000.
- CAUL, E.O. ASHLER, C.R.; DARVILLE, J.M.; BRIDGER, J.C. - Group C rotavirus associated with fatal enteritis in a family outbreak, **J. Med. Virol.**, 30: 201-205, 1990
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL - Laboratory-based surveillance for rotavirus - United States, July 1996-June 1997. **MMWR Morbid Mortal Wkly Rep**, 46: 1092, 1997.
- CHEN, G.; FAN, R.; GUO, X.; HUNT, T. - Group C rotavirus found in sporadic diarrhea in China. **J. Exp. Clin. Virol.**, 2: 1-3, 1988.
- CHIBA, S.; YOKOYAMA, T.; NAKATA, S.; MORITA, S.; URASAWA, T.; TANIGUCHI, K.; URASAWA, S.; NAKAO, T. - Protective effect of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies. **Lancet**, 2: 417-421, 1986.

- CHOU, I.C.; TSAI, C.H.; TSAI, F.J. - Rotavirus associated with poliomyelitis-like syndrome. **Pediatr. Infect. Dis J.**, 17: 930-931, 1998.
- CIMINO, G.D.; METCHETTE, K.C.; TESSMAN, J.W.; HEARST, J.E.; ISAACS, S.T. - Post-PCR sterilization: a method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction. **Nucleic Acids Research**, 19(1): 99-107, 1990.
- CLARK, H.F.; OFFIT, P.A., ELLIS, R.W.; EIDEN, J.J.; KRAH, D.; SHAW, A.R.; PICHICHERO, M.; TREANOR, J.J.; BORIAN, F.E.; BELL, L.M.; PLOTKIN, S.A. - The development of multivalent bovine rotavirus (strain WC3) reassortant vaccine for infants. **J. Infect. Dis.**, 174 (suppl): S73, 1996.
- CLEMENS, J.; RAO, M.; AHMED, F.; WARD, R.; HUDA, S.; CHAKRABORTY, J.; YUNUS, M.; KHAN, M.R.; ALI, M.; KAY, B.; VANLOON, F.; SACK, D. - Breast-feeding and the risk of life-threatening rotavirus diarrhea: prevention or postponement. **Pediatrics**, 92: 680-685, 1993.
- COULSON, B.S.; GRIMWOOD, K.; HUDSON, I.L.; BARNES, G.; BISHOP, R. - Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfection with rotavirus. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 1678-84, 1992.
- CONNER, M.E.; ZARLEY, C.D.; HU, B.; PARSONS, S.; DRABINSKI, D.; GREINER, S.; SMITH, R.; JIANG, B.; CORSARO, B.; BARNIAK, V.; MADORE, H.P.; CRAWFORD, S.; ESTES, M.K. - Virus-like particles as a rotavirus subunit vaccine. **J. Infect. Dis.**, 174 (suppl): S88, 1996.
- COOK, S.M.; GLASS, R.I., LeBARON, C.W.; HO, M.S. - Global seasonality of rotavirus infections. **Bull WHO**, 68: 171-177, 1990.
- COOKE, S.J.; CLARKE, I.N.; FREITAS, R.B.; GABBAY, Y.B.; LAMB DEN, P.R. - The correct sequence of the porcine C/Cowden rotavirus major inner capsid protein shows close homology with human isolates from Brazil and U.K. **Virology**, 190: 531-537, 1992.
- De CHAMPS, C.; LAVERAN, H.; PEIGUE-LAFEUILLE, H.; CHAMBON, M.; DEMEOCQ, F.; GAULME, J.; BEYTOUT, D. - Sequential rotavirus infections: characterization of serotypes and electropherotypes. **Res. Virol.**, 142: 39-45, 1991.
- DENNEHY, P.H.; NELSON, S.M.; CROWLEY, B.A.; SARACEN, C.L. - Detection of rotavirus RNA in hospital air samples by polymerase chain reaction (PCR). **Pediatr. Res.**, 43: 143 A, 1998.
- DENNEHY, P. - Transmission of rotavirus and others pathogens in the home. **The Pediatric Infectious disease Journal**, 19 (10) Supplement October: S103-S105, 2000.

- DERAGON, J.M.; SINNET, G.; POTIER, M.; LA BUDA, D. - Use of gamma irradiation to eliminate DNA contamination for PCR. **Nucleic Acids Research**, 18: 6149, 1990.
- DESSELBERGER, U.; McCRAE, M.A. - The Rotavirus Genome. In: Raming, R.F.(Ed.) - **Rotaviruses**. Germany: Springer- Verlag, 1994. p.31-60.
- DESSELBERGER, U. - Genome rearrangements of rotaviruses. **Adv. Virus Res.**, 46: 69-95, 1996.
- DESSELBERGER, U. - Viral gastroenterites. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 11: 565-575, 1998.
- de ZOYSA, I.; FEACHEN, R.V. - Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: Rotavirus and Cholera immunization. **Bull Who**, 63: 569-83, 1985.
- DIMITROV, D.H.; SHINDAROV, R.S. - Occurrence of antigenically distinct rotaviruses in infants in Bulgaria. **Eur. J. Clin. Microbiol.**, 5: 471-3, 1986.
- DUBOIS, E.; LE GUYADER, F.; HAUGARREAU, L.; KOPECKA, H.; COMIER, M.; POMMEPUY, M. - Molecular epidemiological survey of rotaviruses in sewage by reverse transcriptase seminested PCR and restriction fragment length polymorphism assay. **Appl. Environ. Microbiol.**, 63 (5): 1794-1800, 1997.
- ENGLEBERG, N.C.; HOLBURT, E.N.; BARRETT, T.J.; GARY Jr, G.W.; TRUJILLO, M.H.; FELDMAN, R.A.; HUGHES, J.M. - Epidemiology of diarrhea due to rotavirus on an Indian reservation: Risk factors in the home environment. **J. Infect. Dis**, 145: 894-898, 1982.
- ESTES, M.K.; GRAHAM, D.Y.; GERBA, C.P.; SMITH, E.M. - Simian rotavirus SA11 replication in cell cultures. **J. Virol**, 31: 810-815, 1979.
- ESTES, M.K. - Advances in molecular biology: Impact on on rotavirus vaccine development. **J. Infect. Dis**, 174 (Supl 1): S37-S46, 1996a.
- ESTES, M.K. - Rotavirus and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, B.N. et al. (Eds) - **Virology**, 3rd ed., vol. 1. Philadelphia: lippincott- Raven, 1996b. p. 1631-1632b.
- FANG, Z.Y.; YE, Q.; HO, M.S.; DONG, H.; QING, S.M.; PENARANDA, M.E.; HUNG, T.; WEN, L.Y.; GLASS, R.I. - Investigation of an outbreak of adult diarrhea rotavirus in China. **J. Infect. Dis.**, 60:948-53, 1989.
- FENG, N.G.; VO,P.T.; CHUNG, D.; VO, TV.P.; HOSHINO, Y.; GREENBERG, H.B. - Heterotypic protection following oral immunization with live heterologous rotaviruses in a mouse model. . **Journal of Infectious Diseases**, 175 (2): 330-341, 1997.
- FERSON, M.J.; HENRY, R. - Paediatric rotavirus gastroenteritis: Where to now in prevention and treatment (editorial). **Med. J. Aust.**, 169: 241, 1998.

- FEACHEM, R.G.; KOBLINSKY, M.A. – Intervention for the control of diarrheal disease among young children: promotion of breastfeeding. **Bull WHO**, 62: 271-91, 1984.
- FLEWETT, T.H.; BRYDEN, A.S.; DAVIES, H.; WOODE, G.N.; BRIDGER, J.C.; DERRICK, J.M. - Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. **Lancet**, ii:61-63, 1974.
- FORATTINI, O.P. - **Epidemiologia Geral**. 2^o ed. São Paulo: Artes Médicas, 1996.
- FOSTER, S.O.; PALMER, E.L.; GARY, G.W.; MARTIN, M.L.; HERRMANN, K.L; BEASLEY, J. - Gastroenteritis due to rotavirus in isolated Pacific Island group: na epidemic of 3.439 cases. **J. Infect. Dis**, 141 (1): 32-39, 1980.
- FRANGOSO, M.; KUMAR, A.; MURRAY, D. - Rotavirus in nasopharyngeal secretions of children with upper respiratory tract infections. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**, 4: 87-8, 1986.
- FRASER, D.; DAGAN, R.; PORAT, N.; EL-ON, J.; ALKRINAWI, S.; DECKELBAUM, R.J.; NAGGAN, L. - Persistent diarrhea in a cohort of israeli bedouin infants: role of pathogens and family and environmental factors. **J. Infect. Dis**, 178: 1081-1088, 1998.
- FRESHNEY, R.I. - **Freshney's Culture of Animal Cells. A multimedia Guide**. New York, Wiley-Liss, 1999.
- FRIEDMAN, M.G.; GAIL, A.; SAROV, B.; MAGALITH, M.; KATZIR, G.; MIDTHUN, K.; TANIGUCHI, K.; URASAWA, S.; KAPIKIAN, A.Z.; EDELMAN, R.; SAROV, I. - Two sequential outbreaks of rotavirus gastroenteritis: evidence for syntomatic and asynptomatic reinfection. **J. Infect. Dis.**, 158: 814-822, 1988.
- FU, Z.F. – Detection of an atypical (possibly group C) rotavirus in New Zealand pigs. **NZ Vet. J.**, 35: 115-6, 1987.
- FU, Z.F.; HAMPSON, D.J.; BLACKMORE, D.K. - Detection and survival of group A rotavirus in a piggery. **Vet. Rec.**, 125: 576-578, 1989.
- FUJII, R.; KUZUYA, M.; HAMANO, M.; YAMADA, M.; YAMAZAKI, S. - Detection of human group C rotaviruses by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using monoclonal antibodies. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 1307-1311, 1992.
- GABBAY, Y.B.; MASCARENHAS, J.D.P.; LINHARES, A.C.; FREITAS, R.B. - Atypical rotavirus among children living in Belém, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 84: 5-8, 1989.

- GABBAY, Y.B.; JIANG, B.; OLIVEIRA, C.S.; MASCARENHAS, J.D.P.; LEITE, J.P.G.; GLASS, R.I.; LINHARES, A.C. - An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among children attending a Day-care Center in Belém, Brasil. **J. Diarrhoel. Dis. Res.**, 17(2): 69-74, 1999
- GLASS, R.; STOLL, B.; WYATT, R.; HOSTIENO, Y.; BANU, H.; KAPIKIAN, A.Z. - Observations questioning a protective role for breast-feeding in severe rotavirus diarrhea. **Acta Paediatr. Scand.**, 75: 713-718, 1986.
- GLASS, R.I.; KILGORE, P.E.; HOLMAN, R.C.; JIN, S.; SMITH, J.C.; WOODS, P.^a; CLARKE, M.J.; HO, M.S.; GENTSCH, J.R. - The epidemiology of rotavirus diarrhea in the United States: surveillance and estimates of disease burden. **Journal of Infectious Diseases**, 174(Suppl 1): S5-S11, 1996.
- GOLDING, J.; EMMETT, P.M.; ROGERS, I.S. - Gastroenteritis, diarrhoea and breast feeding. **Early Human development**, 49 Suppl: S83-S103, 1997.
- GOLDWATER, P.; CHRYSTIE, I.; BANATVALA, J. - Rotaviruses and the respiratory tract. **Br. Med. J.**, 2: 1551, 1979.
- GOUVEA, V.; ALLEN, J.R.; GLASS, R.I.; FANG, Z.; BREMONT, M.; COHEN, J.; McCRAE, M.A.; SAIF, L.J.; SINARACHATANANT, P.; CAUL, E.O. - Detection of group B and C rotaviruses by Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.**, 29: 519-23, 1991.
- GOUVEA, V.; RAMIREZ, C.; LI, B.; SANTOS, N; SAIF, L.; CLARK, F.; HOSHINO, Y. - Restriction endonuclease analysis of the VP7 genes of human and animal rotaviruses. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 917-923, 1993.
- GOYAL, S.M.; GERBA, C.P. - Comparative adsorption of human enterovirus, simian rotavirus and selected bacteriophage to soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, 38: 241-250, 1979.
- GREENBERG, H.B.; CLARK, H.F.; OFFIT, P.A. - Rotavirus Pathology and Pathophysiology. In: Raming, R.F.- **Rotaviruses**. Germany: Springer- Verlag, 1994. p. 255-283.
- GRICE A. S.; LAMB DEN P. R.; CAUL E. O.; CLARK, I.N. - Sequence Conservation of the Major Outer Capsid Glycoprotein of Human Group C Rotaviruses. **J. Med. Virol.**, 44: 166-171, 1994.
- GRINSTEIN, S.; GOMEZ, J.A.; BERCOVICH, J.A.; BISCOTTI, E.L. - Epidemiology of rotavirus infection and gastroenteritis in prospectively monitored Argentine families with young children. **Am. J. Epidemiol.**, 130: 300-308, 1989.
- GUARINO, A.; GUANDALINI, S.; ALBANO, F.; MASCIA, A.; RITIS, G.; RUBINO, A. - Eteral immunoglobulins for treatment of protracted rotaviral diarrhea. **Pediatr. Infect. Dis J**, 10: 612, 1991.

- GUNNLAUGSSON, G.; SMEDMAN, L.; Da SILVA, S.C.; GRANDIEN, M.; ZETTERSTROM, R. - Rotavirus serology and breastfeeding in young children in rural Guinea-Bissau. **Acta paediatr. Scand**, 78:62-66, 1989.
- HAMANO, M.; KUZUYA, M.; FUJII, R.; OGURA, H.; MORI, T.; NAKAYAMA, T.; YUEN, E.; KATAYAMA, K.; MITSUNOBU, Y.; INOUE, K. - Outbreak of acute gastroenteritis caused by human group C rotavirus in a primary school. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 52: 170-171, 1999.
- HARLOW, E.; LANE, L. - **Antibodies- A Laboratory Manual**. New York: C. S. Harbor Laboratory, 1988. p.352.
- HART, C. A.; CUNLIFFE, N.A. - Viral gastroenterites. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 12: 447-457, 1999.
- HERRMANN, J.E.; CHEN, S.C.; FYNANN, E.F.; SANTORO, J.C.; GREENBERG, H.B.; WANG, S.; ROBINSON, H.L. - Protection against rotavirus infections by DNA vaccination. **J. Infect. Dis.**, 174 (suppl): S93, 1996.
- HONGOU, K.; KONISHI, T.; YAGI, S.; ARAKI, K.; MIYAWAKI, T. - Rotavirus encephalitis mimicking afebrile benign convulsions in infants. **Pediatr. Neurol.**, 18: 354-357, 1998.
- HUNG, T.; CHEN, G.; WANG, C.; YAO, H.; FANG, Z.; CHAO, T.; CHAO, Z.; YE, W.; CHANG, X.; DEN, S.; LIONG, X.; CHANG, W. - Waterborne outbreak of diarrhea in adults in China caused by a novel rotavirus. **Lancet**, 1: 1139-1142, 1984.
- HURST, C.J. & GERBA, C.P. - Stability of simian rotavirus in fresh and estuarine water. **Appl. Environ. Microbiol.**, 39(1):1-5, 1980.
- INSTITUTE OF MEDICINE - The prospects for immunizing against rotavirus. In: - **New vaccine development. Establishing priorities. Diseases of importance in developing countries.** Vol II. Washington, DC: National Academy Press, 1986: 308-18.
- ISHIMARU, Y.; NAKANO, H.; OSETO, M.; YAMASHITA, Y.; KOBAYASHI, N.; URASAWA, S. - Group C rotavirus infection and infiltration. **Acta Paediatr. Jpn**, 32: 523-9, 1990.
- ISHIMARU, Y.; NAKANOS, S.; NAKANOS, H.; OSETO, M.; YAMASHITA, Y. - Epidemiology of group C rotavirus gastroenteritis in Matsuyama, Japan. **Acta. Paediatr. Jpn.**, 33: 50-6, 1991.
- JAMES, V.L.A.; LAMBDEN, P.R.; CAUL, E.O.; COOKE, S.J.; CLARKE, I.N. - Seroepidemiology of human group C rotavirus in the UK. **J. Med. Virol**, 52: 86-91, 1997.
- JAMES, V.L.A.; LAMBDEN, P.R.; CAUL, E.O.; CLARKE, I.N. - Enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant human group C rotavirus inner capsid protein (VP6) to detect

- human group C rotavirus in fecal samples. **Journal of Clinical Microbiology**, 36 (11): 3178-3181, 1998.
- JIANG, B.M.; SAIF, L.J.; KANG, S.Y.; KIM, J.H. - Biochemical characterization of the structural and nonstructural polypeptides of a porcine group C rotavirus. **J. Virol.**, 64: 3171-3178, 1990.
- JIANG, B.M.; QIAN, Y.; TSUNEMITSU, H.; GREEN, K.Y.; SAIF, L.J. - Analysis of the gene encoding the outer capsid glycoprotein (VP7) of group C rotaviruses by Northern and Dot Blot hybridization. **Virology**, 184: 433-436, 1991.
- JIANG, B.; DENNEHY P.H.; SPANGENBERGER S.; GENTSCH, J.R.; GLASS, R.I. - First Detection of Group C Rotavirus in Fecal Specimens of Children with Diarrhea in the United States. **J. Inf. Dis.**, 172:45-50, 1995.
- JIANG, B.; TSUNEMITSU, H.; DENNEHY, P.H.; OISHI, I.; BROWN, D.; SCHNAGL, R.D. - Sequence conservation and expression of the gene encoding the outer capsid glycoprotein among human group C rotaviruses of global distribution. **Arch. Virol.**, 141: 381-390, 1996.
- KALICA, A.R.; FLORES, J.; GREENBERG, H.B. - Identification of the rotaviral gene that codes for the hemagglutinin and protease-enhanced plaque formation. **Virology**, 125:194-205, 1983.
- KAPIKIAN, A.Z., CHANOCK, R.M. - Rotaviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. et al. (Eds) - **Fields virology**. 2nd ed. V.2. New York: Raven Press, 1990, p.1353-404.
- KAPIKIAN, A.Z., CHANOCK, R.M. - Rotaviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. et al. (Eds) - **Virology**. V.2. Philadelphia: Lippincott-Raven Press, 1996, p.1657-708a.
- KAPIKIAN, A.Z., CHANOCK, R.M. - Rotaviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. et al. (Eds) - **Fields Virology**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996b.
- KESWICK, B.H.; GERBA, C.P. - Viruses in groundwater. **Environ. Sci. Technol.**, 14: 1290-1297, 1980.
- KESWICK, B.H.; PICKERING, L.K.; DuPONT, H.L.; WOOWARD, W.E. - Survival and detection of rotaviruses on environmental surfaces in day care centers. **Appl. Environ. Microbiol.**, 46: 813-6, 1983.
- KILGORE, P.E.; HOLMAN, R.C.; CLARKE, M.J.; SAIF, L.J. - Trends of diarrheal disease-associated mortality in US children, 1968 through 1991. **JAMA**, 274: 1143-8, 1995.

- KIM, Y.; CHANG, K.; STRAW, B. et al. - Characterization of group C rotaviruses associated with diarrhea outbreaks in feeder pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, May: 1484-1488, 1999.
- KOLARI, M.; MANNONEN, S.; TAKALA, T.; SARIS, P.; SUOVANIEMI, O.; SALKINOJA-SALONEN, M. - The effect of filters on aseptic pipetting lifetime of mechanical and electronic pipettors and carryover during pipetting. **Letters in Applied Microbiology**, 29(2): 123-129, 1999.
- KOOPMAN, J.S.; TURKISH, V.J.; MONTO, A.S.; GOUVEA, V.; SCRIVASTAVA, S.; ISSACSON, R.E. - Patterns and etiology of diarrhea in three clinical settings. **Am. J. Epidemiol.**, 119: 114-123, 1984.
- KOOPMANS, M.; BROWN, D. - Seasonality and diversity of group A rotavirus in Europe. **Acta Paediatr.**, 88: 14-19, 1999.
- KUZUYA, M.; FUJII, R.; HAMANO, M.; NAKAMURA, J.; YAMADA, M.; NII, S.; MORI, T. - Molecular analysis of outer capsid glycoprotein (VP7) genes from two isolates of human group C rotavirus with different genome electropherotypes. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 3185-3189, 1996.
- KUZUYA, M.; FUJI, R.; HAMANO, M.; YAMADA, M.; SHINOZAKI, A.; SASAGAWA, S.; HASEGAWA, R.; KAWAMOTO, K.; KAWAMOTO, A.; ITAGAKI, S.; FUNATSUMARU, S.; URUSAWA, S. - Survey of human group C rotaviruses in Japan during the winter 1992 to 1993. **J. Clin. Microbiol.**, 36: 6-10, 1998
- KWOK, S.; HIGUCHI, R. - Avoiding false positives with PCR. **Nature**, 339 (18): 237-238, 1989.
- KWOK, S. - Procedures to minimize PCR-product carry-over. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J. et al. (Eds) - **PCR Protocols - A guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 142-145.
- LAURENTI, R. - Medida das doenças. In: **Epidemiologia Geral**. 2^o ed. São Paulo: Artes Médicas, 1996. p.51-81
- LEAVEL, H. & CLARK, E.G. - **Medicina preventiva**. São Paulo: McGraw-Hill, 1976. p.744
- LINHARES, A.C.; MONCÃO, B.C.; GABBAY, Y.B.; ARAÚJO, V.L.C.; SERRUYA, A.C.; LOURIRO, E.C.B. - Acute diarrhoea associated with rotavirus among children living in Belém, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 77: 384-390, 1983.

- LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; MASCARENHAS, J.D.P.; FREITAS, R.B.; FLEWETT, T.H.; BEARDS, G.M. - Epidemiology of rotavirus subgroups and serotypes in Belem, Brazil: a three-year study. **Ann Inst Pasteur/ Virol.**, 139: 89-99, 1988.
- LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; FREITAS, R.B.; ROSA, E.S.T.; MASCARENHAS, J.D.P.; LOUREIRO, E.C.B. - Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. **Epidem. Inf.**, 102: 129-145, 1989.
- McAULIFFE, J.F.; SHIELDS, D.S.; SOUSA, M.A.; SAKELL, J.; SCHORLING, J.; GUERRANT, R.L. - Prolonged and recurring diarrhoea in the Northeast of Brazil. Examination of cases from a community-based study. **J. Pediatr. Gastroent. Nutr.**, 5: 902-906, 1986.
- MACKOW, E.R. - Group B and C rotaviruses. In: BLASER, M.J.; SMITH, P.D.; RAVDIN, J.I. et al. (Eds) - **Infections of the Gastrointestinal Tract**. New York: Raven Press, 1995. P.983-1008.
- MARKOWSKA-DANIEL, I.; WINIARCZYK, S.; GRADZKI, Z.; PEJSAK, Z. - Evaluation of different methods (ELISA, IF, EM, PAGE) for the diagnosis of rotavirus infection in piglets. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, 19 (3): 219-232, 1996.
- MASCARENHAS, J.D.P.; PAIVA, F.L.; BARARDI, C.R.M.; GABBAY, Y.B.; SIMÕES, C.O.; LINHARES, A.C. - Rotavirus G and P types in children from Belém, Northern Brazil, as determined by RT-PCR: occurrence of mixed P type infections. **J. Diarrhoeal Dis Res**, 16(1): 8-14, 1998.
- MASCARENHAS, J.D.P.; GUSMÃO, R.H.; BARARDI, C.R.M.; PAIVA, L.; SIMÕES, C.O.; GABBAY, Y.B.; MONTEIRO, A.F.; LINHARES, A.C. - Characterization of rotavirus P genotypes circulating among paediatric inpatients in northern Brazil. **Res. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 41 (3): 165-170, 1999.
- MATA, L.; SIMHON, A.; URRUTIA, J.J.; KRONMAL, R.A.; FERNÁNDEZ, R.; GARCÍA, B. - Epidemiology of rotaviruses in a cohort of 45 Guatemalan Mayan Indian children observed from birth to the age of three years. **J. Infect. Dis.**, 148: 452-461, 1983.
- MATHEWS, R.E.F. - The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of Meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Intervirology**, 11:133-135, 1979.
- MATSON, D.O.; ESTES, M.K. - Impact of rotavirus infection at a large pediatric hospital. **Journal of Infectious Diseases**, 162: 598-604, 1990.

- MATSON, D.O.; O'RYAN, M.L.; HERRERA, I.; PICKERING, L.K.; ESTES, M.K. - Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic infections. **J. Infect. Dis.**, 167: 577-83, 1993.
- MATSUMOTO, K., HATANO, M.; KOBAYASHI, K.; HASEGAWA, ^a; YAMAZAKI, S.; NAKATA, S.; CHIBA, S.; KIMURA, Y. - An outbreak of gastroenteritis associated with acute rotaviral infection in schoolchildren. **J. Infect. Dis.**, 160: 611-615, 1989.
- MORIM, M.; MAGAR, R.; ROBINSON, Y. - Porcine group C rotavirus as a cause of neonatal diarrhea in Quebec swine herd. **Can. J. Vet. Res.**, 54: 385-9, 1990.
- MURRAY, C.J.; LOPEZ, A.D. - Global mortality disability and the contribution of risk factors: global burden of disease study. **Lancet**, 349: 1436-1442, 1997.
- NAGESHA, H.S.; HUM, C.P.; BRIDGER, J.C.; HOLMES, H.I. - Atypical rotaviruses in Australian pigs. **Arch. Virol.**, 102: 91-8, 1988.
- NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T. - Interspecies transmission of rotaviruses studied from the perspective of genogroup. **Microbiol. Immunol.**, 37: 337-348, 1993.
- NAKAGOMI, T.; HORIE, Y.; KOSHIMURAY, Y.; GREENBERG, H.B.; NAKAGOMI, O. - Isolation of human rotavirus strain with a super-short RNA pattern and new P2 subtype. **J. Clin. Microbiol.**, 37 (4): 1213-1216, 1999.
- NEWBURYG, D.S.; PETERSON, J.A.; RUIZ-PALACIOS, G.M.; MATSON, D.O.; MORROW, A.L.; SHULTS, J.; GUERRERO, M.D.; CHATURVEDI, P.; NEWBURG, S.O.; SCALLAN, C.D.; TAYLOR, M.R.; CERIANI, R.L.; PICKERING, L.K. - Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. **Lancet**, 351: 1160-1164, 1998.
- NILSSON, M.; SIGSTAM, G.; SVENSSON, L. - Antibody prevalence and specificity to group C rotavirus in Swedish sera. **J. Med. Virol**, 60: 210-5, 2000a.
- NILSSON, M.; SVENUNGSSON, B.; HEDLUND, K.; UHNOO, I.; LAGERGREN, A.; AKRE, T.; SVENSSON, L. - Incidence and genetic diversity of group C rotavirus among adults. **J. Infect. Dis.**, 182: 678-84, 2000b.
- OISHI, I.; YAMAZAKI, K.; MINEKAWA, Y. - An occurrence of diarrheal cases associated with group C rotavirus in adults. **Microbiol. Immunol.**, 37:505-9, 1993.
- OJEH, C.K.; CUSACK, T.M.; YOLKEN, R.H. - Evaluation of the effects of disinfectants on rotavirus RNA and infectivity by the Polymerase Chain Reaction and cell-culture methods. **Molecular and cellular probes**, 9 (5): 341-346, 1995.

- PANCORPO, O.C.; EVANSHEN, B.G.; CAMPBELL, W.F.; LAMBERT, S.; CURTIS, S.K.; WOOLLEY, W. - Infectivity and antigenicity reduction rates of human rotavirus strain Wa in fresh waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 1803-1811, 1987
- PEDLEY, S.; BRIDGER, J.C.; BROWN J.F.; McCRAE, M.A. - Molecular characterisation of rotaviruses with distinct group antigens. *Journal of General Virology*, 64:2093-2101, 1983.
- PENARANDA, M.E.; CUBBITT, W.D.; SINARACHATANANT,P.; TAYLOR, D.N.; LIKANOSAKUL, S.; SAIF, L.; GLASS, R.I. - Group C rotavirus infection in patients with diarrhea in Thailand, Nepal and England. *J. Infect. Dis*, 160: 392-397, 1989.
- PEREIRA, H.L.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; CANDEIAS, J.A.N.; RACZ, M.L.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; TRABULSI, J.R. - Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo, and Belém, Brazil. *Journal of Hygiene*, 90:117-125, 1983.
- PÉREZ-SCHEL, I. - The impact of rotavirus disease in Venezuela. *J. Infect. Dis*, 174 (Supl 1): S19-21, 1996.
- PESARO, F.; SORG, I., METZLER, A. - In situ inactivation of animal viruses and a coliphage in nonaerated liquid and semiliquid animal wastes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 92-97, 1995.
- PICKERING,L.K.; KOHL, S. – Human milk humoral immunity and infant defense mechanisms. In: HOWELL, R.R.; MORRIS, F.H.; PICKERING, L.K. (Eds) – **Human milk in infant nutrition and health**. Springfield, IL: Charles C Thomas Publishing, 1986. p.123-140.
- PICKERING,L.; BARTLETT, A.I.; REVES, P.; MORROW, A. - Asymptomatic excretion of rotavirus before and after rotavirus diarrhea in children in day care centers. *J. Pediatr.*, 12:361-5, 1988.
- PRASAD, B.V.V.; CHIU, W. - Structure of Rotavirus. In: Raming, R.F.(Ed.) - **Rotaviruses**. Germany: Springer- Verlag, 1994. p.9-29.
- PRINCE, A.M.; ANDRUS,L. - PCR: How to kill unwanted DNA. *BioTechniques*, 12(3): 358-359, 1992.
- PUFFER, R.R. & SERRANO, C.V. - Paterns of mortality in childhood: report of the Inter-American Investigation of Mortality in Childhood. Washington, Pan American Health organization, 1973. (Scient. Publ. N° 262)
- RASOOL, N.B.G.; HAMZAH, M.; JEGATHESAN, M.; WONG, Y.H.; QIAN, Y.; GREEN, K.Y. - Identification of a human group C in Malaysia. *J. Med. Virol.*, 43: 209-211, 1994.

- RAMIG, R.F. - Genetics of the rotaviruses. **Annu. Rev. Microbiol.**, 51: 225-55, 1997.
- RAMOS, A.P.D.; STEFANELLI, C.C.; LINHARES, R.E.C.; BRITO, B.G.; SANTOS, N.; GOUVEA, V.; LIMA, R.C.; NOZAWA, C. - The stability of porcine rotavirus in feces. **Veterinary Microbiology**, 71:1-8, 2000.
- RAPHAEL, R.A.; SATTAR, S.A.; SPRINGTHORPE, V.S. - Long-term survival of human rotavirus in raw and treated river water. **Can. J. Microbiol.**, 31: 124-128, 1985.
- REVES, R.R.; HOSSAIN, M.M.; MIDTHUN, K.; KAPIKIAN, M.M.; NAGUIB, T.; ZAKI, A.M.; DuPONT, H.L. - Na observational study of naturally acquired immunity to rotaviral diarrhea in a cohort of 363 Egyptian children. **Am J. Epidemiol.**, 130: 981-988, 1989.
- RHODE, J.E. & NORTHROP, R.S. - Taking science where the diarrhoea is. In: Acute diarrhoea in childhood. Amsterdam, 1976. p. 339-366 (Ciba Foundation Symposium, 42)
- RIEPENHOFF-TALTY, M.; GOUVEA V.; EVANS M.J.; SVENSSON, L.; HOFFENBERG, E.; SOKOL, R.J.; UHNOO, I.; GREENBERG, S.J.; SCAKEL, K.; ZHAORI, G.; FITZGERALD, J.; CHONG, S.; EL-YOUSEF, M.; NEMETH, A.; BROWN, M.; PICCOLI, D.; HYAMS, J.; RUFFIN, D.; ROSSI, T. - Detection of Group C Rotavirus in Infants with Extrahepatic Biliary Atresia. **J. Infect.Dis.**, 174:8-15, 1996.
- RITZLER, M.; PERSCHIL, I.; ALTWEGG, M. - Influence of residual uracil-DNA glycosylase activity on the electrophoretic migration of dUTP-containing PCR products. **Journal of Microbiological Methods**, 35: 73-76, 1999.
- RODRIGUEZ, W.J.; KIM, H.W.; BRANDT, C.D.; SCHWARTZ, R.H.; GARDENER, M.K.; JEFFRIES, B.; PARROTT, R.H.; KASLOW, R.A.; SMITH, J.I.; KAPIKIAN, A.Z. - Longitudinal study of rotavirus infection and gastroenteritis in families served by a pediatric medical practice: clinical and epidemiologic observations. **Pediatr. Infect. Dis J.**, 6: 170-6, 1987.
- ROUQUAYROL, M.Z. - **Epidemiologia & Saúde**. 4^{ed}. Rio de Janeiro: MEDSI, 1994. p. 7-21.
- ROWLAND, M.G.M.; COLE, T.J. & WHITEHEAD, R.G. - A quantitative study into the role of infection in determining nutritional status in Gambian village children. **Brit. J. Nutr.**, 37: 441-447, 1977.
- RYS, P.N.; PERSING, D.H. - Preventing false positives: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. **J. Clin. Microbiol.**, 31(9): 2356-2360, 1993.

- SAIF, L.J.; BOHL, E.H.; CROSS, R.F.; HOUSE, J.A. - Rotavirus -Like, Calicivirus-Like and 23 nm Virus-Like particles associated with diarrhea in young pigs. **J. Clin. Microbiol.**, 12: 105-111, 1980.
- SAIF, L.J.; TERRETT, L.A.; MILLER, K.L.; CROSS, R.F. - Serial propagation of porcine group C Rotavirus (Pararotavirus) in a continuous cell line and characterization of the passaged virus. **Journal of Clinical Microbiology**, 26: 1277-1282, 1988.
- SAIF, L.J.; JIANG, B. - Non group A rotaviruses of humans and animals. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, 85: 339-71, 1994a.
- SAIF, L.J.; JIANG, B. - Nongroup A rotaviruses of humans and animals. In: Raming, R.F.(Ed.). **Rotaviruses**. New York: Springer- Verlag, 1994b.
- SAIF, L.J. - Nongroup A rotaviruses. In: SAIF, L.J.; THIEL, K.W.(Eds.) - **Viral diarrheas of man and animals**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990: 73-95.
- SAIF, L.J.; FERNANDEZ, F.M. - Group A rotavirus veterinary vaccines. **J. Infect. Dis.**, 174 (suppl): S98, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. - **Molecular Cloning- A laboratory manual**. 2nd.ed. U.S.A.: C.S.Harbor Labotory Press, 1989.
- SAN JUAN, C.S.; BELLINZONI, R.C.; MATTION, N.; LATORRE,J.; SCODELLER, E.A. - Incidence of group A and atypical rotaviruses in brazilian pig herds. **Res. Vet. Sci.**, 41: 270-272, 1986.
- SARKAR, G.; SOMMER, S.S. - Parameters affecting susceptibility of PCR contamination to UV inactivation. **BioTechniques**, 10(5):591-593, 1991.
- SANTOS,H.A.M.; YOLKEN, R.; QUIROZ, E. et al. - Detection of rotavirus in respiratory secretions of children with pneumonia. **J. Pediatr.**, 103: 583-5, 1983.
- SATTAR, S.A.; JACOBSEN, H.; RAHMAN, H.; CUSAK, M.S.; RUBINO, J.R. - Interruption of rotavirus spread through chemical disinfection. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, 15(12): 751-756, 1994.
- SCHRANK, A.; FERREIRA,H.B.; SCHRANK, I.S.; RODRIGUES, J.J.S.; REGNER, L.P.; PASSAGLIA, L.M.P.; ROSSETTI, M.L.R.; RAUPP, R.M.; SILVA, S.C.; GAIESKY, V.L.V. - **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. p.307-331.
- SHERLOCK, S. - **Doenças do Fígado e do Sistema Biliar**. 7ª.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988. p. 385.

- SHINOZAKI, K.; YAMANAKA, T.; TOKIEDA, M.; SHIRASAWA, H.; SIMIZU, B. - Isolation and serial propagation of human group C rotaviruses in cell line (CaCo-2). **J. Med. Virol.**, 48: 48-52, 1996.
- SHORNIKOVA, A.V.; CASAS, I.A.; MYKKÄNEN, H.; SALO, E.; VESIKARI, T. - Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. **Pediatr. Infect. Dis J**, 16: 1102, 1997.
- SORIANO-BRUCHER, H.; AVENDANO, P.; O'RYAN, M.; BRAUN, S.D.; MANHART, M.D.; BALM, T.K.; SORIANO, H.A. - Bismth subsalicylate in the treatment of acute diarrhea in children: A clinical study. **Pediatrics**, 87: 18, 1991.
- SOUZA, D.F.C.; FISIELIUS, J.J.; UEDA, M.; GABBAY, Y.B.; CARMONA, R.C.C.; TIMENETSKY, M.C.S.T.; MASCARENHAS, J.D.P.; TAKIMOTO, S.; TANAKA, H. - An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among adults living in Valentim Gentil, São Paulo State, Brazil. **J. Diarrhoeal Dis. Res**, 16 (2): 59-65, 1998.
- STEELE Jr, J.C.H. - Rotavirus. **Clinics in Laboratory Medicine**, 19 (3): 691-703, 1999.
- STEWIEN, K.E.; CUNHA, L.C.F.; ALVIM, A.C.; REIS FILHO, S.A.; ALVIM, M.A.B.; BRANDÃO, A.A.P.; NEIVA, M.N.R. - Rotavirus associated diarrhoea during infancy in the city of S. Luís (MA), Brazil: a two-year longitudinal study. **Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo**, 33(6): 459-464, 1991.
- SWAMINATHAN, B.; MATAR, G.M. - Molecular typing methods. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. (Eds) - **Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications**. Washington, D.C., ASM, 1993. p. 26-50.
- TAKAHASHI, S.; OKI, J.; MIYAMOTO, A.; KOYANO, S.; ITO, K.; AZUMA, H.; OKUNO, A. - Encephalopathy associated with haemophagocytic lymphohistiocytosis following rotavirus infection. **Eur. J. Pediatr.**, 158:133-137, 1999.
- TANIGUCHI, K.; URASAWA, T.; URASAWA, S. - Reactivity patterns of human rotavirus strains of a monoclonal antibody against VP2, a component of the inner capsid of rotavirus. **Arch. Virol**, 87: 135-141, 1986.
- TANIGUCHI, K.; URASAWA, S. - Diversity in rotavirus genomes. **seminars in VIROLOGY**, 6: 123-131, 1995.
- TEIXEIRA, J.M.S.; CAMARA, G.N.N.L.; PIMENTEL, P.F.V.; FERREIRA, M.N.R.; FERREIRA, M.S.R.; ALFIERI, A.A.; GENTSCH, J.R.; LEITE, J.P.G. - Human group C rotavirus in children with diarrhea in the Federal District, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 31:1397-1403, 1998.

- TIMENETSKY, M.C.S.T.; KISIELIUS, J.J.; GRISI, S.J.F.E.; ESCOBAR, A.M.; UEDA, M.; TANAKA, H. - Rotavirus, Adenovirus, Astrovirus, Calicivirus, and Small Virus particles in faeces of children with and without diarrhea within the period of 1987 to 1988, in São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 35: 275-280, 1993.
- TSUNEMITSU, H.; SAIF, L.J.; JIANG, B.M.; SHIMIZU, M.; HIRO, M.; YAMAGUCHI, H.; ISHIYAMA, T.; HIRAI, T. - Isolation characterisation, and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA104). **Journal of Clinical Microbiology**, 29: 2609-2613, 1991.
- TSUNEMITSU, H.; JIANG, B.; YAMASHITA, Y.; OSETO, M.; USHIJIMA, H.; SAIF, L.J. - Evidence of serological diversity within group C rotavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, 30: 3009-3012, 1992a.
- TSUNEMITSU, H.; JIANG, B.; SAIF, L.J. - Detection of group C antigens and antibodies in animals and humans by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 2129-34, 1992b.
- USHIJIMA, H.; HONMA, H.; MUKOYAMA, A.; SHINOZAKI, T.; FUJITA, Y.; KOBAYASHI, M.; OSETO, M.; MORIKAWA, S.; KITAMURA, T. - Detection of group C rotavirus in Tokyo. **J. Med. Virol.**, 27: 299-303, 1989.
- VELAZQUEZ, F.R.; MATSON, D.O. CALVA, J.J.; GUERRERO, M.L.; MORROW, A.L.; CARTER-CAMPBELL, S.; GLASS, R.I.; ESTES, M.K.; PICKERING, L.K.; RUIZ-PALACIOS, G.M. - Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. **N. Engl. J. Med**, 335: 1022-8, 1996.
- VISCIDI, R.P.; BOBO, L.; HOOK III, W.; QUINN, T.C. - Transmission of Chlamydia trachomatis among Sex partners assessed by polymerase chain reaction. **J. Infect. Dis.**, 168: 488-92, 1993.
- vonBONSDORFF, C.H.; SVENSSON, V. - Human serogroup C rotavirus in Finland. **Scand J. Infect. Dis.**, 20: 475-478, 1988.
- VONSOVER, A.; SHIFF, I.; SILBERSTEIN, H.; RUDICH, H.; ABOUDY, Y.; MENDELSON, L.; SHULMAN, T.; NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O. - Identification of feline -and-canine-like rotaviruses isolated from humans by restriction fragment length polymorphism assay. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 1783-1787, 1993.
- WATSON, J.D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J.; ZOLLER, M. - **Recombinant DNA**. 2nd ed. New York: S.A. Books, 1992. p.66

- WARD, R.; BERNSTEIN, D.; YOUNG, E.; SHERWOOD, J.; KOWLTON, D.; SCHIFF, G. - Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. **J. Infect. Dis**, 154: 871-80, 1986.
- WARD, R.L.; BERNSTEIN, D.I.; KNOWLTON, D.R.; SHERWOOD, J.R.; YOUNG, E.C.; CUSAK, T.M.; RUBINO, J.R.; SCHIFF, G.M. - Prevention of surface-to-human transmission of rotavirus by treatment with disinfectant spray. **J. Clin. Microbiol.**, 29: 1991-1996, 1991.
- WARD, R.L.; CLEMENS, J.D.; KNOWLTON, D.R.; RAO, M.R.; VANLOON, F.P.L.; HUDA, N.; AHMED, F.; SCHIFF, G.M.; SACK, D.A. - Evidence that protection against rotavirus diarrhea after natural infection is not dependent on serotype-specific neutralizing antibody. **J. Infect. Dis**, 166: 1251-1257, 1992.
- WARD, R.L.; BERNSTEIN, D.I. - Protection against rotavirus disease after natural rotavirus infection. **J. Infect. Dis**, 169: 900-904, 1994.
- WEINBERG, R.; TIPTON, C.; KLISH, W.; BROWN, M.R. - Effect of breast feeding on morbidity in rotavirus gastroenteritis. **Pediatrics**, 74: 250-253, 1984.
- WILDE, J.; EIDEN, J.; YOLKEN, R. - Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. **J. Clin. Microbiol.**, 28: 1300-1307, 1990.
- WILDE, J.; VAN, R.; PICKERING, L.; EIDEN, J.; YOLKEN, R. - Detection of rotaviruses in the day care environment by reverse transcriptase polymerase chain reaction. **J. Infect. Dis.**, 166: 507-11, 1992.
- WITHDRAWAL of rotavirus vaccine recommendation. **MMWR**, 48: 1007, 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - The rational use of drugs in the management of acute diarrhea in children. Geneva, **WHO**, 1990.
- XU, L.; HARBOUR, D.; McCRAE, M.A. - The application of polymerase chain reaction to detection of rotaviruses in feces. **J. Virol. Methods**, 27: 29-38, 1990.
- YEAGER, M.; BERRIMAN, J.A.; BAKER, T.S.; BELLAMY, A.R. - Three-dimensional structure of the rotavirus hemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis. **The EMBO Journal**, 13 (5): 1011-1018, 1994.
- YUNES, J. - Evaluation of infant mortality and proportional infant mortality in Brazil. **Wld. Hlth. Statis. Quart.**, 34: 200-219, 1981.
- ZANG, M.D.; ZENG, C.Q.Y.; DONG, Y.J.; BALL, J.M.; SAIF, L.J.; MORRIS, A.P.; ESTES, M.K. - Mutations in rotavirus non-structural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. **J Virol**, 72:3666-3672, 1998.

- ZHAORI, G.; FU, L.; XU, Y.; GUO, Y.; PENG, Z.; SHAN, W. - Detection of rotavirus antigen in tracheal aspirates of infants and children with pneumonia. **Chin. Med. J. (Engl)**, 104: 830-3, 1991.
- ZHENG, B.J.; CHANG, R.; MA, G.Z.; XIE, J.M.; LIU, Q.; LIANG, X.R.; NG, M.H. - Rotavirus infection of the oropharynx and respiratory tract in young children. **J. Med. Virol.**, 34: 29-37, 1991.
- ZHENG, B.J.; MA, G.Z.; TAM, J.S.L.; LO, S.K.F.; NG, M.H.; LAM, B.C.C.; YEUNG, C.Y.; LO, M. - The effects of maternal antibodies on neonatal rotavirus infection. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 10: 865-868, 1991.
- ZHU, Y.S.; ISAACS, S.T.; CIMINO, G.D.; HEARS, J.E. - The use of exonuclease III for polymerase chain reaction sterilization. **Nucleic Acids Research**, 19 (9): 2511, 1991.