



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

RAFAELA CHEMELLO PANKOV

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE
ROTAVÍRUS A EM POPULAÇÃO INFANTIL COM E SEM DIARREIA NO
SEMIÁRIDO BRASILEIRO.**

FORTALEZA

2017

RAFAELA CHEMELLO PANKOV

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE
ROTAVÍRUS A EM POPULAÇÃO INFANTIL COM E SEM DIARREIA NO
SEMIÁRIDO BRASILEIRO.**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P11c Pankov, Rafaela Chemello.
Caracterização molecular e análise filogenética de rotavírus A em população infantil com e sem diarreia no Semiárido Brasileiro / Rafaela Chemello Pankov. – 2017.
92 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima .
1. Diversidade genética de Rotavírus A. 2. Gastroenterite infantil. 3. Semiárido Brasileiro. I. Título.
CDD 616.9
-

RAFAELA CHEMELLO PANKOV

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE ROTAVÍRUS A EM POPULAÇÃO INFANTIL COM E SEM DIARREIA NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO.

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

Aprovada em: 26/Julho/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Universidade Federal do Ceará
(Orientador)

Profª. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira
Universidade Estadual do Ceará

Dra. Marcelle Figueira Marques da Silva
Pós-doutoranda pela Fundação Oswaldo Cruz

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças e coragem para seguir em frente e superar todas as adversidades da vida e principalmente por me guiar e ajudar a seguir em busca dos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, o Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, por ter confiado em mim e me dado essa oportunidade de crescimento pessoal e profissional, por todo o conhecimento compartilhado e por todo o apoio para conclusão do projeto.

Agradeço aos meus amigos do LDI: Adelvane Rodrigues, Alejandra Velasco, Ana Karolina Santos, Claudiane Bessa, Herlice Veras, Jeanine Pereira, Jefferson Oliveira, Jessica Cerón, Júlio Werner, Lyvia Magalhães, Mara Prata, Márcio Guanabara, Mariana Bona, Marília Maia, Paloma Araújo, Pedro Henrique Quintela, Rafaella Gondim, Samilly Ribeiro, Tamara Rodrigues, Thiago de Freitas, e Vinícius Alves, por toda a ajuda desde o início quando vim para o laboratório até hoje, por todos os momentos de descontração e por todo o conhecimento dividido.

Agradeço a Ana Karolina Santos, Herlice Veras, por terem me ajudado na escolha do projeto, ao Pedro Henrique Quintela por ter me ajudado a montar e escrever o projeto que hoje dou conclusão, a Mara Prata por ter me ajudado com todas as análises finais e escrita, e a Rafaella Gondim por ter sido a minha parceira de viagem e experimentos na Fiocruz.

Agradeço ao José Amadeus, Luciana França, Charliene Melo, Charles Melo e Kátia Lima por todo apoio, por sempre estarem disponíveis a ajudar nas atividades dentro e fora do laboratório.

Agradeço a toda equipe do INCT, UPC-IBIMED, Ana Maria B. de Oliveira, Antônio S. Neto, Charles R. S. de Melo, Domingos B. de Oliveira, Eva Maria G. Coura, Fabiana Maria S. Nascimento, Flávio A. Lima, Francisco S. Júnior, Francisco F. Mariano, Hilda B. de Oliveira, José Amadeus Souza, José Quirino S. Filho, Kátia Maria L. Nogueira, Luciana F. da Silva, Mara M. G. Prata, Maria Lúcia de Oliveira, Nathalia O. Lima, Thallyson F. R. Soares e Zélia Maria O. de Vasconcelos.

Agradeço aos pais e responsáveis pelas crianças desse presente estudo, pela colaboração para a realização do mesmo, permitindo a doação de amostras clínicas, e respondendo aos questionários.

Agradeço ao Doutor José Paulo Gagliardi Leite por toda a ajuda e paciência para solucionar os problemas com os experimentos, por todo conhecimento em rotavirologia compartilhado e por ter me dado à oportunidade de vivenciar uma experiência única de estar

em outro estado em um laboratório de referência ao redor de pessoas que acrescentaram muito em meus conhecimentos.

Agradeço a todos da equipe do LVCA – Fiocruz: Alexandre Fialho, Carmen Baur, Dadade Xavier, Eduardo Volotão, Fábio Malta, Irene Trigueiros, Janaina Rodrigues, Juliana Andrade, Marcelle Bottecchia, Marcelle Figueira, Mariela Martínéz, Marize Miagostovich, Monica Rocha, Rosane Assis, Túlio Fumian e Xica Alves, por terem me recebido de braços abertos, por todo o conhecimento compartilhado, por todas as conversas, por todos os momentos de descontração e principalmente por toda ajuda durante o período que passei no Rio de Janeiro.

Agradeço aos meus amigos do LVCA: Christian Sagave, Janaina Rodrigues, Juliana Andrade, Lorena Pedrosa, Marcelle Bottecchia, Marcelle Figueira, Mariana Caldas, Matheus Assis, Pedro Ivo Neves e Túlio Fumian, pela companhia de cada um no meu dia a dia, por me ajudarem com os experimentos, pelas conversas e por toda a diversão na hora dos nossos almoços.

Agradeço especialmente ao Túlio Fumian, por toda dedicação durante os períodos de experimentos, por todo conhecimento compartilhado, por toda paciência para explicar sobre os programas de edição para filogenética e principalmente por todo apoio e incentivo durante esse processo.

Agradeço especialmente à Marcelle Figueira, que é a minha luz no fim do túnel, que me pegou totalmente perdida com os experimentos, me deu a mão e me ajudou a concluir tudo que eu precisava para obter esse trabalho, por ter se dedicado quase que exclusivamente ao meu projeto nesse momento final, por me ajudar com a escrita e a revisão desse trabalho, por ser a minha “mamãe” na rotavirologia, meu mais sincero agradecimento a ela por ter me acolhido, ajudado e apoiado, por sempre me incentivar e me mostrar que tudo daria/dará certo.

Agradeço à coordenação e secretaria do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Dra Sâmia Brilhante, e a Carolinda Soares, pela eficiência, paciência, e ajuda com possíveis esclarecimentos.

Agradeço as professoras e examinadoras das bancas de qualificação e defesa, Professora Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, Dra. Marcelle Figueira e Professora Maria Fátima da Silva

Teixeira por terem aceitado participar destes momentos e por toda ajuda para melhorar este trabalho.

Agradeço à FUNCAP, pelo incentivo financeiro.

Por fim e não menos importante agradeço imensamente à minha família, principalmente aos meus pais, Sergio Pankov e Magda R. F. C. Pankov, e irmãos, Sergio P. Júnior e Rachel C. Pankov por todos os momentos de apoio e ajuda, e por me mostrarem que mesmo nas dificuldades somos capazes de fazer do impossível o possível.

Agradeço ao meu sogro Hélder V. de Araújo e à minha sogra Michelle A. Queiroz, por serem minha segunda família e por toda a ajuda que eles me deram e dão, pelos momentos de descontração, de conversa e apoio.

Agradeço do fundo do meu coração ao meu namorado Levi Q. de Araújo, por ter sido o meu porto seguro em todos os momentos difíceis, por ter sido meu melhor amigo e ouvinte nos dias de estresse e cansaço, por ser quem me incentiva sempre ao bem e para seguir em busca dos meus sonhos e objetivos, por me proporcionar a felicidade de tê-lo sempre ao meu lado.

Agradeço a minha madrinha, Christianne Picanço, por ter me dado todo o apoio que eu precisei durante os meses que fiquei no Rio de Janeiro, por ter sido minha companheira de seriados e filmes nos momentos de descontração, não tenho palavras para agradecer o tamanho do seu carinho por mim.

Desta forma, agradeço a todos que me ajudaram direta ou indiretamente para concluir mais essa etapa e continuar seguindo o caminho da pós-graduação e pesquisa científica.

A todos vocês, MUITO OBRIGADA!

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.” **(Robert Collier)**

RESUMO

O Rotavírus A (RVA) é um dos principais agentes etiológicos da gastroenterite aguda (GA) infantil e é responsável por aproximadamente 40% dos casos de diarreia em crianças com até 5 anos de idade em todo o mundo. Após a introdução da vacina Rotarix[®] (RV1) no Brasil houve uma redução da taxa de mortalidade infantil por GA, contudo ainda há altos índices de morbidade. Este estudo tem como objetivo a caracterização epidemiológica, molecular e análise filogenética das cepas de RVA circulantes na população infantil do Semiárido Brasileiro. Como parte do projeto Recodisa, foram incluídas 1200 crianças entre 2 e 36 meses de idade, sendo considerado casos as crianças que apresentaram pelo menos um episódio de diarreia nos 14 dias anteriores a coleta de fezes, e foram recrutados participantes das cidades de Crato (CE), Picos (PI), Ouricuri (PE), Cajazeira (PB), Souza (PB) e Patos (PB) durante os anos de 2009 a 2011. Após o diagnóstico por Luminex, foi verificada uma prevalência de 7,1% (86/1200) de positividade para RVA. A partir deste diagnóstico, 291 amostras, foram selecionadas para análise por PCR em tempo real (qRT-PCR), detecção do gene que codifica a VP6, além do sequenciamento dos genes que codificam para as proteínas VP4 e VP7. Através do qRT-PCR, foi demonstrado positividade de 10,65% para RVA associada a diarreia infantil ($P=0,0472$). Ademais, a presença de RVA foi relacionada ao gênero masculino ($P=0,0216$). Já a ausência de RVA foi associada ao primeiro ($P=0,0001$) e ao terceiro ano de vida ($P=0,0190$), corroborando com as taxas de vacinação, onde 89,3% das crianças do estudo receberam as duas doses da vacina. O aleitamento materno exclusivo também foi associado com a ausência de RVA ($P=0,0012$). Grande parte das crianças com RVA apresentaram diminuição dos sintomas e 80,7% estado nutricional normal. Através da análise dos genes que codificam a VP7 e VP4, foram detectados os genótipos G1, G2 e G3 e P[4], P[8] e P[9], respectivamente, sendo G1P[8] a combinação mais prevalente (57%). Combinações menos comuns também foram detectadas, como G1P[4], G2P[8] e G3P[9]. A análise filogenética das cepas mostra que as amostras genotipadas como P[8] pertencem à linhagem P[8]-1, esta é a mesma linhagem da RV1 e possuem similaridade nucleotídica variando entre 98 e 100%. Sugere-se que as amostras G1 e P[8], evidenciam casos de “shedding” vacinal. Dessa forma, com o vírus da vacina excretado no meio ambiente, uma proteção direta é oferecida as crianças não vacinadas, conseqüentemente o efeito de vacinação por rebanho, pode ser benéfico para populações com baixa cobertura vacinal. Assim é possível concluir que após a introdução de RV1 e outras medidas preventivas, houve uma redução nos casos de RVA, além de os resultados contribuírem para o entendimento da diversidade genética de RVA em crianças carentes do Semiárido Brasileiro.

Palavras-chaves: Diversidade genética de rotavírus A, gastroenterite infantil, Semiárido Brasileiro.

ABSTRACT

Rotavirus A (RVA) is the major cause of infantile acute gastroenteritis, being responsible for approximately 40% of all diarrhea cases in children younger than 5 years of age worldwide. After the Rotarix vaccine (RV1) introduction in Brazil, the rates of childhood gastroenteritis-related deaths decreased, however, morbidity rates are still high. This study aimed to investigate the epidemiology, clinical features, vaccination impact and genetic diversity of circulating RVA strains associated with acute gastroenteritis, in children from Semiarid region in northeastern Brazil. As part of the Recodisa project was included 1200 children in the age group 2-36 months, whereas cases were children with an episode of diarrhea in the last 14 days, and was recruited participants from the cities of Crato (CE), Picos (PI), Ouricuri (PE), Cajazeiras (PB), Souza (PB) and Patos (PB) during the years 2009 to 2011. The initial clinical diagnosis showed RVA prevalence of 7.1% (86/1200) using Luminex. Subsequently, 291 samples were selected for analysis by real-time PCR (qRT-PCR), to detection of the gene coding for VP6 and sequence analyses of the genes encoding VP4 and VP7. By using qRT-PCR, the detection rate of RVA was 10.65% positive, which was associated with infantile diarrhea ($P = 0.0472$). In addition, RVA infections was related to the male gender ($P = 0.0216$). The absence of RVA was associated with the first one ($P = 0.0001$) and the third year of life ($P = 0.0190$), corroborating with the vaccination rates, where 89,3% of the children in the study received the two doses of the vaccine. Exclusive breastfeeding was also associated with the absence of RVA ($P = 0.0012$). The majority of children with RVA were observed slightly reduced symptoms of acute gastroenteritis and 80.7% presented a good nutritional status. The genotypes G1, G2 and G3 and P[4], P[8] and P[9] were detected, and the most prevalent combination was G1P[8] (57%). Rare combinations were also detected, such as G1P[4], G2P[8] and G3P[9]. The phylogenetic analysis of the strains shows that the genotype samples as P[8] belong to the lineage P[8]-1, this is the same lineage of RV1 and have nucleotide similarity ranging from 98 to 100%. It is suggested that samples G1 and P[8] show evidence of vaccine shedding. Thus, the vaccine's virus excreted into the environment, is linked to direct protection of unvaccinated children, consequently the effect of herd immunity provides a measure of protection for populations with low vaccine coverage. In conclusion, this study observed that after the introduction of RV1 and other preventive measures, there was a reduction in cases of RVA, besides the results contribute to the understanding of the genetic diversity of RVA in children from Semiarid region in northeastern Brazil.

Keywords: Rotavirus A genetic diversity, Child gastroenteritis, Brazilian Semiarid.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Partícula viral do Rotavírus A _____	21
FIGURA 2: Estrutura da partícula viral do Rotavírus A _____	22
FIGURA 3: Estrutura e proteínas da partícula viral dos Rotavírus A _____	23
FIGURA 4: Esquema estrutural do genoma dos Rotavírus A da cepa protótipo _____	24
FIGURA 5: Representação esquemática da proteína VP4 _____	25
FIGURA 6: Representação esquemática do evento de <i>reassortments</i> em Rotavírus A _____	31
FIGURA 7: Representação esquemática do ciclo de replicação dos Rotavírus A _____	33
FIGURA 8: Incidência de mortes por Rotavírus A _____	37
FIGURA 9: Distribuição dos genótipos de Rotavírus A no Brasil por região geográfica _____	38
FIGURA 10: Distribuição dos genótipos de Rotavírus A no Brasil entre os anos de 2005 e 2009 _____	39
FIGURA 11: Região do Semiárido Brasileiro _____	44
FIGURA 12: Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de RT-PCR para os genes que codificam para as proteínas VP6, VP4 (VP8*) e VP7 de Rotavírus A _____	58
FIGURA 13: Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica parcial (887 pb) do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) de amostras de Rotavírus A _____	60
FIGURA 14: Identidade nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) entre amostras dos Estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Piauí e amostra da vacina RV1 (RVA/Human-TC/USA/Rotarix/2009/G1P8 - JX943612) _____	61
FIGURA 15: Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica completa (1062 pb) do gene que codifica para a proteína VP7 de amostras de Rotavírus A _____	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Classificação de Rotavírus A _____	29
TABELA 2: Prevalência de Rotavírus A em cidades do estudo _____	45
TABELA 3: Distribuição das amostras selecionadas dentro dos grupos positivos – negativos e caso – controle por cidade do estudo _____	45
TABELA 4: Iniciadores e sonda utilizados para detecção de Rotavírus A _____	48
TABELA 5: Reagentes usados no PCR em Tempo Real para detecção de Rotavírus A _____	48
TABELA 6: Reagentes usados no RT-PCR para amplificação dos genes que codificam para VP6, VP4 (VP8*) e VP7 _____	49
TABELA 7: Iniciadores usados nas reações de RT-PCR dos genes que codificam para VP6, VP4 (VP8*) e VP7 _____	50
TABELA 8: Distribuição de Rotavírus A por cidade do estudo em relação ao grupo caso e controle _____	53
TABELA 9: Caracterização da população infantil positiva para Rotavírus A do Semiárido Brasileiro _____	55
TABELA 10: Sintomatologia clínica relatada pelos responsáveis pelas crianças com amostra positiva para Rotavírus A _____	56
TABELA 11: Dados antropométricos das crianças com e sem Rotavírus A _____	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa: Aminoácidos

BAZ: Do inglês: “*BMI-for-age Z-score*” - Z-score de índice de massa corpórea por idade

BLAST: Do inglês: “*Basic Local Alignment Search Tool*”

Ca²⁺: Íon cálcio

CDC: Do inglês: “*Center for Disease Control and Prevention*” - Centro Norte-americano de Controle de Doenças

CE: Ceará

COMEPE: Comitê de Ética em Pesquisa da UFC

CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

DLP: Do inglês: “*Double Layer Particle's*” – Partículas virais de dupla camada

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ácido etilenodiamino tetracético

EGPA: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

ELISA: Do inglês: “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*” – Ensaio Imunoenzimático

EUA: Estados Unidos da América (*United States of America, USA*)

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

GA: Gastroenterite Aguda

HAZ: Do inglês: “*Height-for-age Z-score*” - Z-score de altura por idade

IC: Índice de Confiança

ICTV: Do inglês: “*International Committee on Taxonomy of Viruses*” – Comitê Internacional de Taxonomia dos vírus

INF: Do inglês: “*Interferon*” - Interferon

LDI: Laboratório de Doenças Infecciosas

MAL-ED: Do inglês: “*The Etiology, Risk factors and interactions of enteric infections and Malnutrition and the Consequenses for Child Health*”

ME: Microscopia Eletrônica

mL: Mililitro

MM: Marcador Molecular

N: Número

NAOH: Hidróxido de Sódio

NCBI: Do inglês: “*National Center for Biotechnology Information*”

NDPkinase: Do inglês: “*Nucleoside diphosphate kinase*”

nm: Nanômetros

NSP: Do inglês: “*Non structural protein*” – Proteína não-estrutural

NTPase: Do inglês: “*nucleoside triphosphatase*”

OMS: Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, WHO)

OR: Do inglês: “*Odds Ratio*”

ORF: Do inglês: “*Open reading frame*” - Fase de leitura aberta

PB: Paraíba

pb: Pares de Base

PCR: Do inglês: “*Polymerase Chain Reaction*” - Reação em cadeia da polimerase

PE: Pernambuco

pH: Potencial Hidrogeniônico

PI: Piauí

PNI: Programa Nacional de Imunização

qPCR: Do inglês: “*quantitative Polymerase Chain Reaction*” - Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

RCWG: Do inglês: “*Rotavirus Classification Working Group*”

RE: Retículo endoplasmático

RNA: Ácido ribonucleico

RNA_{df}: RNA de dupla fita

RNA_m: RNA mensageiro

rpm: Rotações por minuto

RTPase: Do inglês: “*Ribonucleic acid triphosphatase*”

RT-PCR: Do inglês: “*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*” – Reação de transcriptase reversa seguida por reação em cadeia da polimerase

RV: Rotavírus

RVA: Rotavírus A

TBE: Tris-Borato-EDTA

SAGE: Do inglês: “*Strategic Advisory Group of Experts on Immunization*” - Grupo de Assessoria Estratégica de Especialistas em Imunização

SLP: Do inglês: “*Single Layer Particle's*” – Partículas virais de camada simples

tc: Do inglês: “*tissue culture*”

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TLP: Do inglês: “*Triple Layer Particle's*” – Partículas virais de tripla camada

TRO: Terapia de Reidratação Oral

UFC: Universidade Federal do Ceará

UPC/IBIMED: Unidade de Pesquisa Clínicas/ Instituto de Biomedicina

UV: Ultravioleta

VLPs: Do inglês: “*Virus-like Particles*” - Partículas semelhantes a vírus

VP: Do inglês: “*Viral structural protein*” - Proteína estrutural

VORH: Vacina Oral de Rotavírus Humano

WAZ: Do inglês: “*Weight-for-age Z-score*” - Z-score de peso por idade

wt: Do inglês: “*wild type*”

WHZ: Do inglês: “*Weigth-for-heigth Z-score*” - Z-score peso por altura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 – Histórico	21
2.2 – Partícula e genoma viral	22
2.3 – Proteínas estruturais (VP)	24
2.4 – Proteínas não estruturais (NSP)	26
2.5 – Classificação dos Rotavírus A	27
2.6 – Diversidade Genética dos Rotavírus A	29
2.6.1 – Mutações Pontuais	29
2.6.2 – Rearranjos Genéticos	30
2.6.3 – Reestruturação de Segmentos Genômicos (<i>Reassortments</i>)	30
2.7 – Replicação viral	31
2.8 – Patogêneses	34
2.9 – Tratamento e prevenção	34
2.10 – Epidemiologia dos Rotavírus A	36
3. JUSTIFICATIVA	41
4. OBJETIVOS	42
4.1 – Objetivo Geral	42
4.2 – Objetivos Primários	42
4.3 – Objetivos Secundários	42
5. MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1 – Ética do Estudo	43
5.2 – Caracterização da população	43
5.3 – Extração do RNA fecal	46
5.3.1 – Extração por Kit Comercial	46
5.3.2 – Extração pelo Método de Boom	46
5.4 – Diagnóstico de Rotavírus A	47
5.4.1 – Luminex	47
5.4.2 – Ensaio Imunoenzimático para pesquisa de Rotavírus A	47
5.4.3 – Amplificação do gene NSP3 por PCR em Tempo Real	47
5.4.4 – Amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP6, VP4 (VP8*) e VP7 por RT-PCR	49

5.5 – Análise por eletroforese em gel de agarose a 2%	50
5.6 – Purificação dos produtos amplificados de Rotavírus A para sequenciamento	51
5.7 – Sequenciamento dos genes amplificados de Rotavírus A	51
5.8 – Análise das sequências	51
5.9 – Análise estatística	52
6. RESULTADOS	53
6.1 – Detecção e epidemiologia dos Rotavírus A	53
6.2 – Dados clínicos e antropométricos da população	55
6.3 – Amplificação dos genes que codificam para VP6, VP4 (VP8*) e VP7 para análise por sequenciamento	57
6.4 – Análise filogenética	59
6.4.1 – Análise do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*)	59
6.4.2 – Análise do gene que codifica para a proteína VP7	61
7. DISCUSSÃO	64
8. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO A - Comitê Nacional de Ética em Pesquisa	82
ANEXO B – Comitê de Ética em Pesquisa da UFC	84
ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	85
ANEXO D – Ficha epidemiológica	87

1 INTRODUÇÃO

A gastroenterite aguda (GA) representa um grande problema de saúde pública mundial, acometendo uma em cada dez crianças com idade inferior a cinco anos (Liu et al, 2011). Consiste em uma inflamação do trato gastrointestinal sendo caracterizada principalmente pelo surgimento de diarreia (3 ou mais episódios de evacuações líquidas ou pouco consistentes por dia) e está associada às condições socioeconômicas e sanitárias, de modo que os casos mais graves são verificados com mais frequência em países em desenvolvimento (Guerrant et al., 2013).

A desnutrição é um importante fator de risco para a ocorrência de GA, devido ao comprometimento dos mecanismos de defesa imunológica. Em contrapartida, infecções entéricas persistentes podem prejudicar a capacidade absorptiva do indivíduo, levando a um quadro de desnutrição. Desta forma, desencadeando um ciclo vicioso de diarreia-desnutrição (Guerrant et al., 2001; Moore et al., 2010).

A GA pode ter diversas etiologias: bactérias, vírus, parasitas e toxinas (Black et al., 2010; WHO 2013). Dentre os patógenos virais, o rotavírus A (RVA) é o principal agente etiológico de diarreia em crianças com até 5 anos, e é responsável por aproximadamente 40% dos casos de diarreia infantil (WHO, 2013) e aproximadamente 215.000 mortes por ano em crianças de até 5 anos de idade (Tate et al., 2016)

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Grupo de Assessoria Estratégica de Especialistas em Imunização (SAGE) declararam a introdução de uma vacina contra RVA no Programa Nacional de Imunização (PNI) de diversos países, e recomendaram duas vacinas: uma vacina G1P[8] monovalente: Rotarix[®]-RV1 (*GlaxoSmithKline* GSK, Rixensart, Bélgica) e G1-G4P[8] e uma pentavalente, RotaTeq[®]-RV5 (Merck, North Wales, PE, EUA), e esta medida tinha como objetivo prevenir as hospitalizações e mortes causadas por RVA (WHO, 2009). No Brasil, a vacina RV1 foi introduzida em 2006 e desde então as taxas de cobertura vacinal tem aumentado significativamente em todo o país (Linhares & Justino, 2014).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

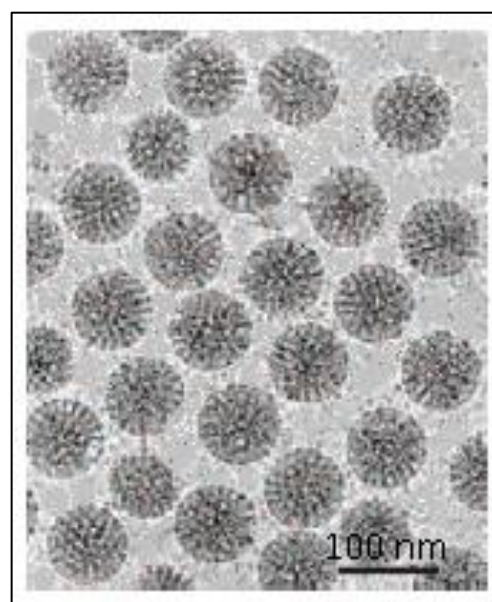
2.1 Histórico

Em 1973 Bishop e colaboradores descreveram a presença de partículas virais através de microscopia eletrônica (ME) em biópsia da mucosa duodenal de crianças com GA não bacteriana e devido à semelhança com os Orbivírus, esses vírus receberam o nome de *Orbivirus-like agent* (Bishop et al., 1973).

Partículas virais também foram descritas por Flewett e colaboradores (1974) em amostras de fezes de crianças com GA. Em 1975 Davidson e colaboradores propuseram uma nova nomenclatura para o vírus, Duovírus (Davidson et al., 1975). Finalmente, em 1978, foi proposto o nome rotavírus (RV) devido a semelhança da partícula viral a uma roda (**Figura 1**) e a constituição de um novo gênero, denominado *Rotavírus*, constituinte da família *Reoviridae* (Fleweet & Wood, 1978).

No Brasil, os RV foram descritos pela primeira vez por Linhares e colaboradores (1977), na cidade de Belém do Pará, onde foram selecionadas 32 crianças com GA, entre 0 e 5 anos de idade, e após a análise das fezes de 13 crianças, através de ME, 2 foram diagnosticadas com RVA.

FIGURA 1: Partícula viral do Rotavírus A (Adaptado de Estes & Greenberg, 2013).



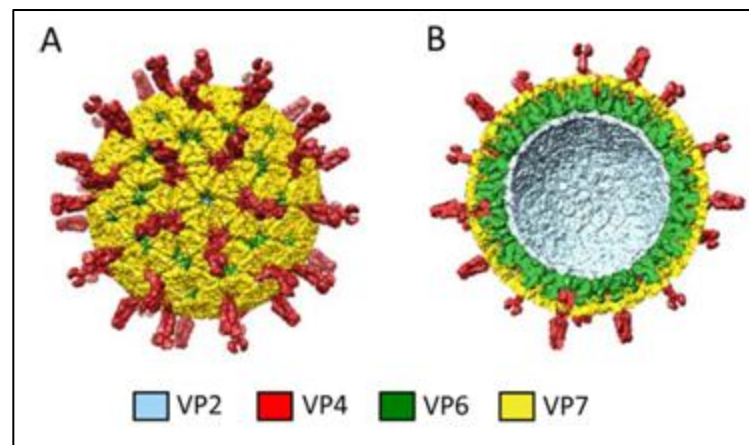
Partícula viral de Rotavírus A visualizadas através da técnica de microscopia eletrônica. Partículas de tripla camada proteica (TLP) e dupla camada proteica (DLP).

2.2 Partícula e genoma viral

A partícula viral completa (vírion) apresenta aproximadamente 100 nm de diâmetro, simetria icosaédrica, três camadas proteicas e é desprovida de envelope (**Figura 2A**) (Estes & Greenberg, 2013). A camada proteica interna, ou core viral, é composta por 120 trímeros da proteína VP2. Acredita-se que a região terminal da proteína VP2 estabeleça ligação com o complexo da polimerase viral composto pelas proteínas VP1 (RNA-polimerase RNA-dependente viral) e VP3 (atividade guanilil e metiltransferase) (McClain et al., 2010).

A camada intermediária é constituída por 260 trímeros de VP6 que permite uma maior estabilidade do core viral e funciona como um adaptador para a camada mais externa do vírion, que é essencial para a adsorção e internalização do vírus na célula do hospedeiro. A camada mais externa, por sua vez, é composta por 260 trímeros da glicoproteína VP7, posicionados diretamente sobre os trímeros da proteína VP6, juntamente com os 60 trímeros de proteína VP4, que apresentam diferentes mudanças conformacionais durante a internalização do vírus na membrana da célula do hospedeiro (**Figura 2B**) (Patton et al., 2012).

FIGURA 2: Estrutura da partícula viral do rotavírus A (Adaptado de Patton et al., 2012).

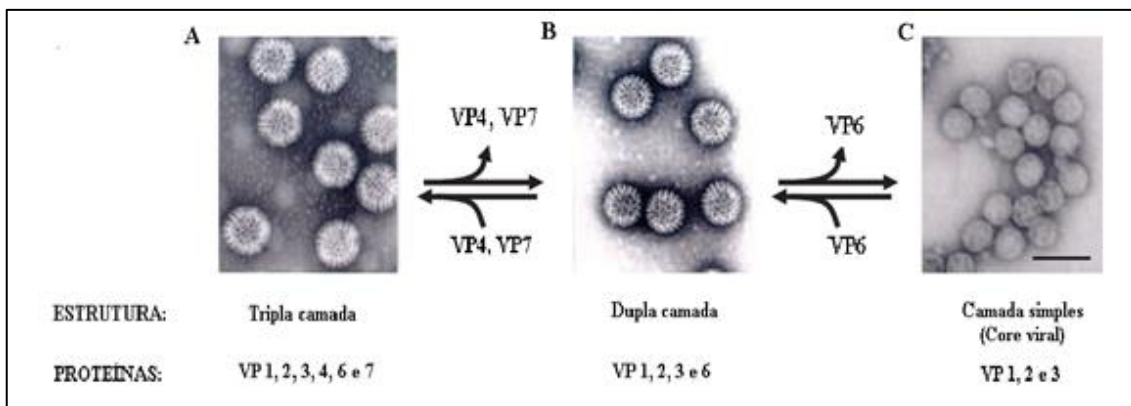


A: Esquema da partícula viral completa (vírion); B: Corte do vírion revelando as três camadas proteicas (VP2, VP6 e VP7) e as espículas de VP4 que se estendem as camadas de VP6 e VP7.

Os vírions de RVA podem diferir entre si morfologicamente e podem ser observados três tipos de partículas através da ME (**Figura 3**). A partícula completa é infecciosa e chamada de “partícula com tripla camada” (TLP – *triple-layered particle*) (Figura 3A); A partícula que não apresenta a camada mais externa é chamada de “partícula com dupla camada” (DLP – *Double-layered particle*) e, demonstra uma aparência rugosa devido a

algumas projeções proteicas da camada mais interna (Figura 3B); O terceiro tipo de partícula é composto exclusivamente pela camada interna, ou core viral, sendo chamada de “partícula de camada simples” (SLP – *single-layered particle*) e está associada ao genoma viral (Figura 3C) (Estes & Greenberg, 2013).

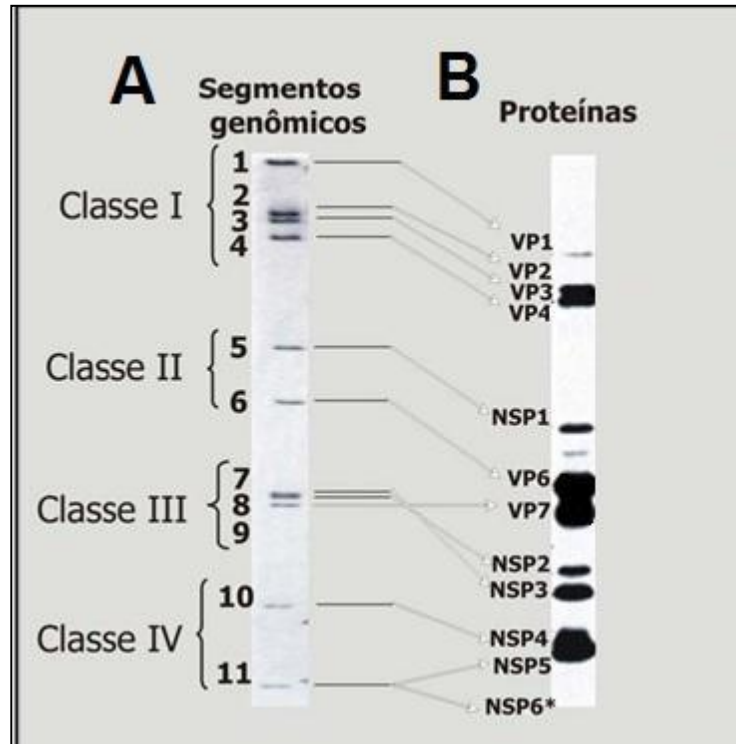
FIGURA 3: Estrutura e proteínas da partícula viral dos rotavírus A (Adaptado de Estes & Greenberg, 2013).



A: Partícula com tripla camada (TLP – *triple-layered particle*); B: Partícula com dupla camada (DLP- *double-layered particle*); C: Partícula de camada simples (SLP – *single-layered particle*).

O genoma dos RVA é constituído de 11 segmentos de RNA de dupla fita (RNAdf) que variam de tamanho entre 667 (segmento 11) a 3302 (segmento 1) pares de bases (pb) e, tem no total aproximadamente 18.556 pb. Cada segmento genômico é responsável por codificar uma proteína viral, com exceção do segmento 11, que tem como função a codificação de duas proteínas. Entre as proteínas codificadas por esses segmentos, seis são estruturais (VP1-4, 6 e 7) e seis são não estruturais (NSP1-6) (**Figura 4**) (Estes & Greenberg, 2013).

FIGURA 4: Esquema estrutural do genoma dos Rotavírus A da cepa protótipo (Adaptada de Conner & Ramig, 1997).



A: Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) dos 11 segmentos do genoma do rotavírus A da cepa protótipo símio SA-11. B: Gel de poliacrilamida mostrando a separação das proteínas estruturais (VP1-4, 6 e 7) e das proteínas não estruturais (NSP1-6) sintetizadas pelo rotavírus A.

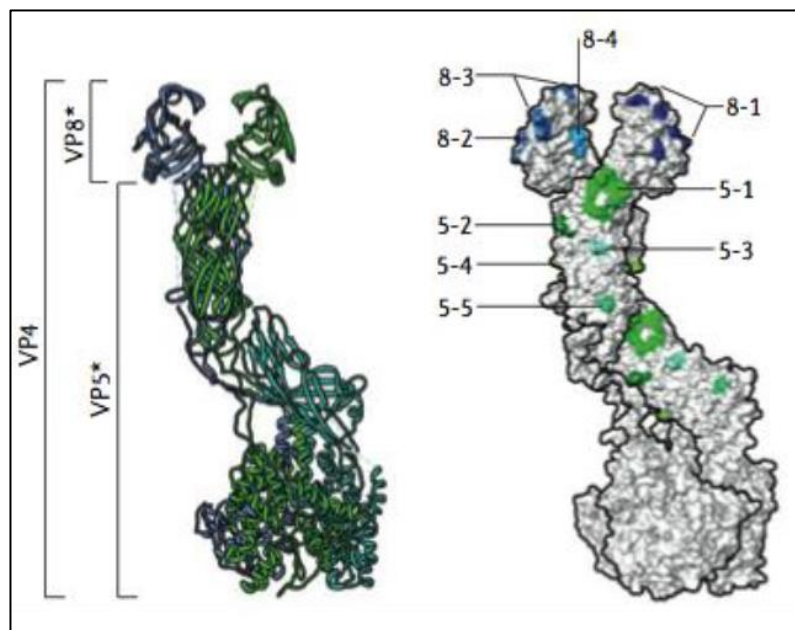
2.3 Proteínas estruturais (VP)

A proteína VP1 é a RNA polimerase dependente de RNA que apresenta função de replicase e transcriptase viral. A VP2 é a proteína mais abundante do core viral e faz parte do complexo de replicação. Através de um domínio na sua porção N-terminal, liga-se tanto a VP1 quanto a VP3 (Arnoldi et al., 2007; McDonald et al., 2009). Além disso, a VP2 também interage com a proteína VP6 nos estágios iniciais da morfogênese viral. A interação entre as duas proteínas (VP2 e VP6) é fundamental para a formação das DLPs (Estes & Greenberg, 2013). A proteína VP3 demonstra atividades guanidil e metiltransferase; e é a enzima responsável pela adição da CAP ao RNA. Sendo assim a enzima responsável por modificar a extremidade 5' da molécula de RNA, gerando uma estrutura de capeamento similar a encontrada no RNA mensageiro (RNAm) de eucariotos (McDonald & Patton, 2011).

A proteína VP4 é representada por projeções espiculares sobre a camada mais externa do vírion e, está associada a importantes funções, como: adesão e internalização à célula,

hemaglutinação, neutralização e virulência (Dunn et al., 1995; Ludert et al., 1996). É suscetível à proteólise, o que leva a exposição de sítios ativos que provoca a penetração do vírus na célula (Arias et al., 1996; Estes & Greenberg, 2013). Para a ativação da proteína VP4 é necessário à clivagem proteolítica da mesma, o que resulta em dois peptídeos VP5* e VP8*, os quais permanecem associados ao vírion. VP5* tem atividade de neutralização cruzada entre os diferentes tipos de VP4 e, possivelmente, possui os epítomos encarregados pela adsorção do vírus à célula (Kirkwood et al., 1996). VP8* contém a maioria dos epítomos associados às reações tipo-específicas, dependentes da ligação deste com ácido siálico (Isa et al., 1997). Nove epítomos de neutralização foram mapeados em VP4, sendo cinco deles em VP5* (5-1 a 5-5) e quatro em VP8* (8-1 a 8-4) (**Figura 5**) (Trask et al., 2012; Estes & Greenberg, 2013)

FIGURA 5: Representação esquemática da proteína VP4 (Adaptada de Trask et al., 2012).



Representação esquemática da proteína VP4, os peptídeos VP5* e VP8* e dos sítios antigênicos (VP5*: 5-1 a 5-5; VP8*: 8-1 a 8-4).

A proteína mais abundante do vírion é a VP6, representando aproximadamente, 51% da partícula viral. Provavelmente esta seja a causa pela qual a maioria dos anticorpos produzidos durante a infecção dos RVA seja contra essa proteína (Svensson et al., 1987). Além de ser a proteína de escolha para triagem de RVA (Estes & Greenberg, 2013). A proteína VP6 é constituída por dois domínios: um que interage com VP7 e VP4 da camada externa e outro que interage com VP2 do core. Dessa forma, VP6 participa em duas funções importantes para os RVA: a) adsorção e penetração na célula; b) transcrição do RNAdf

(Heiman et al., 2008), além disso, a VP6 é responsável por classificar os RV em diferentes espécies (A-I) (Matthijnssens et al., 2012; ICTV, 2016).

A glicoproteína VP7 é a mais imunogênica da camada externa, tem a função de modular VP4 no processo de adsorção e penetração dos RVA na célula do hospedeiro, interagindo com proteínas da família das integrinas, na superfície celular, após o processo de adsorção mediado pela porção VP5* da proteína VP4 (Guerrero et al., 2000). Em concentrações apropriadas, íons Ca^{2+} são necessários para a estabilidade de VP7, na sua ausência, os trímeros da proteína encontram-se dissociados, promovendo a liberação da VP7 do vírion. Essa mudança conformacional de VP7 reflete em um arranjo distinto para VP4, que possibilita a entrada do vírion na célula. Anticorpos neutralizantes contra a VP7 estabilizam o trímeros formado pela proteína, inibindo as alterações em VP4, necessárias para permitir que o vírus entre na célula hospedeira (Aoki et al., 2009).

2.4 Proteínas não estruturais (NSP)

O segmento genômico 5 é responsável por codificar a proteína NSP1, que é a proteína viral menos conservada dos RVA (Dunn et al., 1995). Essa proteína tem a capacidade de modular a ativação de interferon (*INF*) tipo I, que é crítica para encadear uma resposta imune inespecífica em casos de infecção viral (Barro & Patton, 2005; Graff et al., 2009).

A proteína NSP2 é comumente encontrada associada a NSP5, ambas são conhecidas por formarem estruturas chamadas de viroplasma. Dentre suas funções, NSP2 tem a capacidade de se unir ao RNAs e apresenta atividade de helicase, *NTPase* (*Nucleoside triphosphatase*), *NDPkinase* (*Nucleoside diphosphate kinase*) e *RTPase* (*Ribonucleic acid triphosphatase*) (Taraporewala et al., 1999, 2001; Carpio et al., 2006; Kumar et al., 2007). Além de estar envolvida com a transcrição, tradução, replicação e empacotamento do RNAdf (Estes & Greenberg, 2013).

A proteína NSP3 é codificada pelo segmento genômico 7 e atua na tradução do RNAm e na interrupção da síntese proteica da célula hospedeira. Porém, estudos demonstram que a NSP3 não é fundamental para a tradução do RNA viral (Padilla-Noriega, *et al.*, 2002; Varani & Allain, 2002; Montero *et al.*, 2006).

A primeira enterotoxina viral descrita foi a NSP4, que é codificada pelo segmento 10 (Ball et al., 1996). Dentro da célula a proteína NSP4 encontra-se distribuída em diversos

sítios, e participa dos eventos de morfogênese, replicação e patogênese dos RVA. A proteína completa encontra-se ancorada no retículo endoplasmático (RE) através do domínio hidrofóbico N-terminal e a porção C-terminal encontra-se no citoplasma. As propriedades biológicas importantes associadas a NSP4 estão localizadas na região citoplasmática constituída pelo intervalado entre os aa 45 e 175, e são estas: mobilização do Ca^{2+} intracelular e permeabilização da membrana; união ao Ca^{2+} e a VP4; união às partículas semelhantes a vírus (VLPs “Virus-like Particles”); indução da diarreia em camundongos. Além disso, a secreção parcial dessa proteína, contendo os aa 112 a 175 também é capaz de induzir a diarreia, bem como a proteína completa (Zhang et al., 2000).

O segmento 11 é composto por duas ORFs: A maior é responsável por codificar a proteína NSP5, que apresenta atividade autoquinase e em células infectadas pode se apresentar nas formas hipo e hiper fosforiladas (Taraporewala & Patton, 2004) e a menor, por sua vez, codifica a proteína NSP6, que tem interação com a NSP5 no viroplasma. Algumas cepas de RVA não codificam esta proteína enquanto outras apresentam baixos níveis de expressão, o que indica que NSP6 está envolvida em papel regulatório não essencial na replicação viral (Taraporewala & Patton, 2004; López et al., 2005).

2.5 Classificação dos Rotavírus A

Reconhecidas oficialmente pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), o gênero *Rotavírus* possui 9 espécies (grupos) que são Rotavírus A (RVA) até Rotavírus I (RVI) (Kindler et al., 2013; Mihalov-Kovcs et al., 2015; ICTV, 2016).

Os RVA podem ser classificados por seu padrão de migração dos 11 segmentos de RNAdf quando submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), apresentando perfil super curto, curto, longo ou atípico; padrão de hibridização do genoma completo de RNA (genogrupos); propriedades antigênicas de VP6, VP7 e VP4 (subgrupos, sorotipo G e sorotipo P, respectivamente); análise das sequências nucleotídicas de todos os segmentos genômicos (genótipos); e as sequências dos genes que codificam para as proteínas da camada externa, VP7 e VP4, são responsáveis por diferenciar os RVA de acordo com a classificação binária por genótipos G e P, respectivamente (Matthijnsens et al., 2011; Estes & Greenberg 2013).

O sistema de classificação baseado na análise das sequências dos 11 segmentos genômicos foi descrito pelo *Rotavirus Classification Working Group I (RCWG)*, o qual recomenda que as sequências virais obtidas devam ser nomeadas através dos seguintes parâmetros: a) a espécie (grupo) de RV; b) a origem do vírus (animal ou humano) e também se a sequência é oriunda de um vírus selvagem (*Wild type – wd*) ou de vírus cultivado em célula (*Tissue culture – tc*); c) o país onde o vírus foi detectado, usando o código padrão de três letras; d) o nome comum dado pelo pesquisador; e) ano da detecção; f) os genótipos G e P (GXP[X]) (Matthijnssens et al., 2011).

Os diferentes genótipos para cada um dos segmentos são divididos de acordo com valores de corte onde compreendem a similaridade nucleotídica. Até o presente momento já foram descritos 35 G-, 50 P-, 26 I-, 21 R-, 19 C-, 19 M-, 30 A-, 20 N-, 21 T-, 26 E-, e 21 H genótipos, onde cada letra maiúscula representa, respectivamente, os genes que codificam para as proteínas VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 (**Tabela 1**) (RCWG, 2017). E caso o vírus se apresente em uma constelação genômica I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1, I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, ou I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3 ele se classifica como pertencente ao genótipo 1 (ou *Wa-like*), 2 (ou *DS-1-like*), ou *AU-1-like*, respectivamente (Matthijnssen & Van Ranst, 2012).

TABELA 1: Classificação de Rotavírus A (Adaptada de Matthijnsens et al., 2011).

Gene	Valor de cut-off de identidade nucleotídica (%)^a	Genótipos^b	Designação do nome dos genótipos
VP7	80	35G	Glicoproteína
VP4	80	50P	Sensível a Protease (Tripsina)
VP6	85	26I	Capsídeo Interno
VP1	83	21R	RNA Polimerase Dependente de RNA
VP2	84	19C	Proteína do <i>Core</i>
VP3	81	19M	Metiltransferase
NSP1	79	30A	Antagonista do Interferon
NSP2	85	20N	NTPase
NSP3	85	21T	Promotor Traducional
NSP4	85	26E	Enterotoxina
NSP5	91	21H	Fosfoproteína

A: Valores de corte (%) de identidade nucleotídica que definem os diferentes genótipos de rotavírus A, considerando-se os 11 segmentos genômicos. B: Genótipos descritos e reconhecidos pelo Rotavirus Classification Working Group em última atualização em abril de 2017.

2.6 Diversidade genética dos Rotavírus A

Os RVA possuem uma grande diversidade genética que é proveniente de mecanismos como mutações pontuais, rearranjos genéticos e reestruturação de segmentos genômicos (*reassortment*) (Estes & Greenberg 2013; Desselberger 2014).

2.6.1 Mutações pontuais

As mutações pontuais ocorrem frequentemente nos RVA e, são observadas através da técnica de sequenciamento nucleotídico. Essas mutações podem ser sinônimas ou silenciosas, que não provocam mudanças na sequência de aa e, conseqüentemente, na proteína; ou podem ser não-sinônimas, podendo assim causar uma mudança genética que forneça uma vantagem evolutiva ou provocando uma perda de função ou estrutura do vírus. A ocorrência das mutações pontuais está relacionada ao fato de que a RNA polimerase RNA dependente não

possui um mecanismo de correção de erros, o que gera o acúmulo dessas mutações pontuais que podem definir novas linhagens e sublinhagens dentro de um mesmo genótipo (Gómara et al., 2003; Estes & Greenberg 2013).

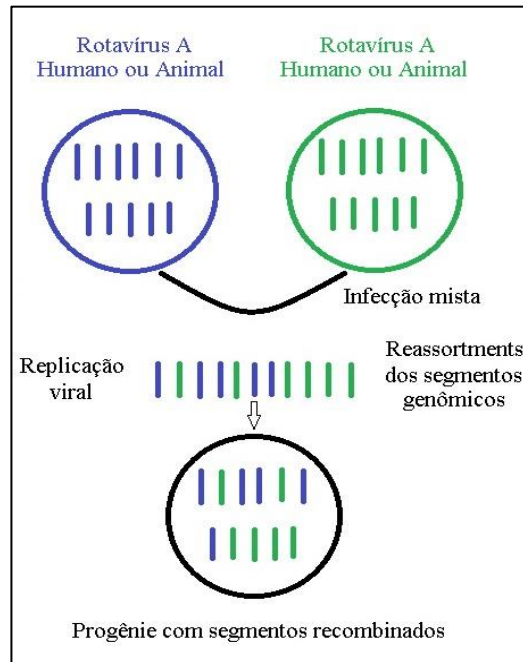
2.6.2 Rearranjos genéticos

Os rearranjos consistem em alterações na sequência do segmento genômico, mais frequentemente em forma de duplicação, mas algumas vezes ocorre como deleção. Isto é caracterizado pela modificação no perfil de migração dos segmentos de RVA no gel de EGPA (Taniguchi & Urasawa, 1995). Os rearranjos são resultados de erros de transcrição de um único segmento e possuem a duplicação parcial de um gene, com consequências variadas na expressão de suas funções. Provavelmente isso ocorre no momento da transcrição, por uma falha da RNA polimerase RNA dependente, onde ela retorna para sua fita molde e reinicia a transcrição a partir de diferentes estágios (Desselberger, 1996).

2.6.3 Reestruturação de segmentos genômicos (*Reassortments*)

As reestruturações de segmentos genômicos ou *reassortments* foram descritas primeiramente por Matsuno e colaboradores em 1980, através da realização de uma co-infecção em cultura celular de RVA bovino (Lincoln) e RVA símio (SA-11), onde por meio da análise eletroforética comparativa entre o clone e os parentais, foi visto que o genoma restruturado apresentava os segmentos 4, 5 e 10 de SA-11 e segmentos 1, 2, 3, 6 e 11 de bovino, porém a origem dos segmentos 7, 8 e 9 não foi determinada. Dessa forma, os *reassortments* são caracterizados pela troca de material genético entre dois vírus semelhantes durante infecções mistas. Para os RVA, essa troca ocorre entre dois ou mais segmentos genômicos de duas cepas, que podem ser humana-humana, humana-animal ou animal-animal, assim gerando um progênie com segmentos oriundos das duas cepas originais (**Figura 6**) (Matsuno et al., 1980).

FIGURA 6: Representação esquemática do evento de *reassortments* em Rotavírus A.



Representação esquemática do evento de *reassortments*: duas cepas de Rotavírus A semelhantes, durante uma infecção mista no processo de replicação realizam a troca dos segmentos genômicos entre si e formam uma progênie com os segmentos recombinados.

2.7 Replicação viral

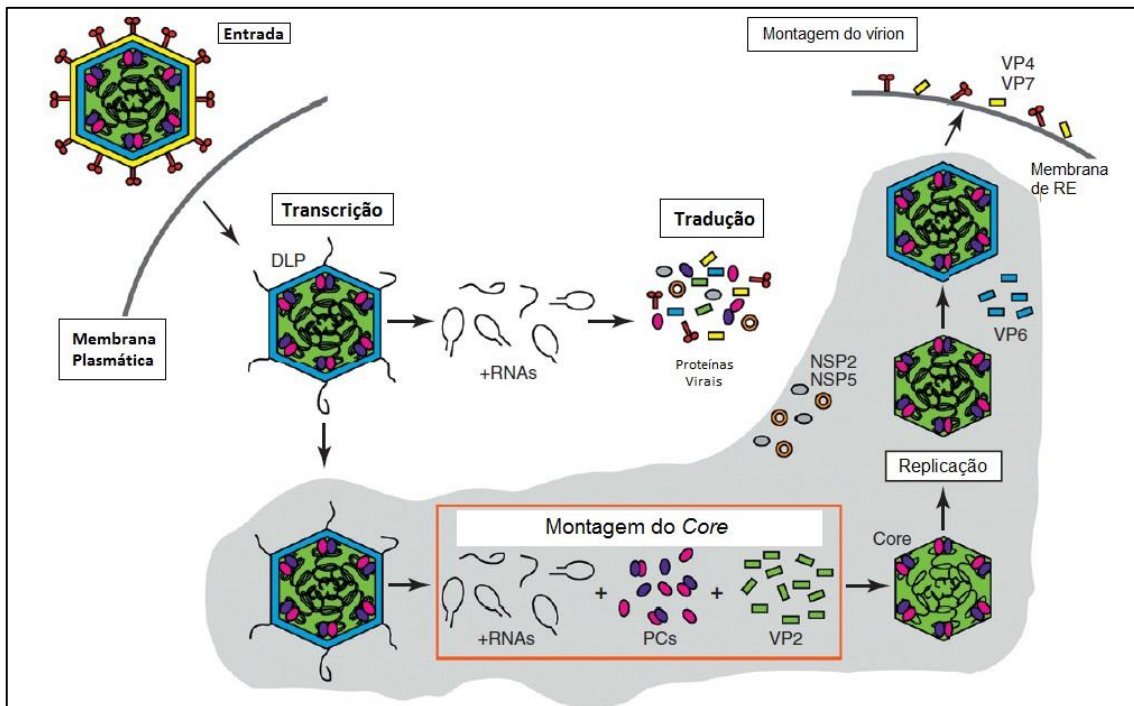
O processo de replicação do RVA inicia com a adsorção do vírion à membrana plasmática da célula hospedeira, através da ligação das espículas virais da camada externa (VP4) com receptores específicos. Durante o processo de adsorção a proteína VP4 sofre clivagem por meio da ação de tripsina e se divide em dois peptídeos: VP8*, que é responsável pela ligação do vírus à célula. Em alguns casos observou-se que esse peptídeo interage com o ácido siálico na superfície celular; e, o VP5*, que junto com a proteína VP7, interage com integrinas e proteínas choque térmico cognato 70 (HSC70) (Trask et al., 2012; Estes & Greenberg, 2013).

A penetração do vírus na célula do hospedeiro pode ocorrer de duas formas: penetração direta ou endocitose (indireta). Na penetração direta, após a adsorção do vírus à célula, ocorre a perda do capsídeo externo e a DLP entra no citoplasma, resultando na alteração da permeabilidade da membrana plasmática, associado à ação de enzimas proteolíticas (Estes & Greenberg, 2013). Na endocitose o vírion não sofre a ação das enzimas proteolíticas e permanece aprisionada dentro do endossomo, este por sua vez, se liga a lisossomos e, aparentemente, não ocorre à replicação viral, mas sim a degradação da partícula.

Desta forma, observa-se que não há o desenvolvimento de infecção produtiva. Assim sugere-se que a baixa concentração de Ca^{2+} dentro das vesículas endocíticas solubilize as proteínas da camada externa, promovendo a lise da mesma e liberação da DLP no citoplasma (Venkataram et al., 2001; Estes & Greenberg, 2013).

Por sua vez, a DLP inicia o processo de replicação através da ativação do complexo interno da polimerase (VP1 e VP3) e os RNA(+) capeados são transcritos e servem como RNAm na síntese das proteínas virais assim como moldes para formação dos RNA(-). As proteínas sintetizadas e o RNAs viral se reúnem no citoplasma da célula infectada e formam um material amorfo chamado de viroplasma. O empacotamento do genoma se inicia quando há ligação de VP1 com a extremidade 3' do RNA(+). Neste momento o complexo VP1-3 sintetizam a fita de RNA(-), completando o RNAdf dos RVA. A proteína VP6 reconhece que o core foi sintetizado e forma a DLP. A NSP4, por sua vez, possui domínio citoplasmático que ancora as DLPs, através de VP6 e VP4, e proporciona o brotamento das partículas no interior do retículo endoplasmático (RE). Logo após a camada externa é formada resultando em partículas virais maduras com diâmetro aproximado de 100 nm. As proteases intestinais clivam a proteína VP4 em VP5* e VP8* após a liberação do vírion da célula, e finalmente resulta no vírion completo infeccioso (McDonald & Patton, 2011). A liberação dos RVA da célula do hospedeiro ocorre através de lise celular ou através de via secretora (**Figura 7**) (Musalem & Espejo, 1985; Jourdan *et al.*, 1997; Trask et al., 2012).

FIGURA 7: Representação esquemática do ciclo de replicação dos Rotavírus A (Adaptada de McDonald & Patton, 2011)



Ciclo de replicação dos RVA: as proteínas externas, VP7 e VP4, entram em contato com a membrana plasmática na célula do hospedeiro, a proteína VP4 sofre clivagem por meio de tripsina e se divide em dois peptídeos, VP5* e VP8*, as proteínas VP8* e VP7 interagem com integrinas e a VP5* se liga ao ácido siálico, ocorrendo assim à adsorção do vírus na célula, a entrada do vírus ocorre por penetração direta, e neste processo o vírus perde a camada mais externa e se transforma em DLP. A DLP inicia a replicação através da ativação do complexo interno da polimerase (VP1 e VP3) e os RNA(+) são transcritos e servem como RNAm na síntese das proteínas virais e molde para a formação dos RNA(-). As proteínas NSP2 e NSP5, já sintetizadas, se reúnem no citoplasma da célula e formam o viroplasma. Neste momento o empacotamento do genoma se inicia com a ligação da VP1 com a extremidade 3' do RNA(+). O complexo VP1-3 sintetiza a fita de RNA(-) completando o RNAdf dos RVA. A proteína VP6 reconhece a formação do core e se liga formando as DLPs. A NSP4 possui domínio citoplasmático que ancora as DLPs, através de VP6 e VP4 e proporciona o brotamento das partículas no interior do retículo endoplasmático. Logo após, a camada externa é formada, resultando em partículas virais maduras. As proteases intestinais clivam a proteína VP4 (VP5* e VP8*) após a liberação do vírus na célula, e finalmente resultando no vírion (partícula infecciosa). Por fim, o vírion é liberado através de lise celular ou por meio de via secretora.

2.8 Patogênese

Os RVA são conhecidos por sua alta infecciosidade e por serem capazes de se adaptarem ao hospedeiro, assim podendo infectar igualmente os homens e os animais (Franco et al., 2006). Os enterócitos maduros são as principais células afetadas nas infecções por RVA. A destruição da vilosidade na porção apical dos enterócitos causa a redução na capacidade absorptiva, resultando na diarreia (WHO, 2013).

O espectro clínico da doença é amplo, variando de diarreia aguda a severa e vômitos, podendo causar desidratação, distúrbios eletrolíticos, choque e morte. O RVA é transmitido por via fecal-oral e seu tempo de incubação é de 1-3 dias e nos casos típicos, o aparecimento da doença é abrupta, com febre e vômitos seguida de diarreia aquosa explosiva, e a reposição inadequada de fluídos pode acarretar na desidratação. Os sintomas gastrointestinais desaparecem normalmente de 3-7 dias após a infecção, mas nos casos mais severos podem durar de 2 a 3 semanas (WHO,2013).

A GA causada pelo RVA é mais frequente em crianças menores de 5 anos de idade (CDC,2011), e acredita-se que crianças com idade mais avançada e adultos sofram com episódios mais brandos e/ou assintomáticos devido a imunidade adquirida em múltiplos episódios de infecções por RVA durante a vida (Anderson & Weber, 2004). Estudos demonstram que episódios recorrentes de infecção por RVA são significativamente mais brandos que a primo-infecção, principalmente entre os segundo e terceiro episódios (Gladstone et al., 2011; Mohan et al., 2017).

2.9 Tratamento e prevenção

O tratamento das GA causadas por RVA é basicamente a reposição de fluídos e eletrólitos. Em casos agudos, é recomendada a terapia de reidratação oral (TRO), e para casos de desidratação severa, é necessário a terapia de reidratação venosa (CDC 2016). A assistência médica e a terapia nutricional são importantes para ajudar a diminuir as taxas de morbidade e mortalidade causadas por RVA. E até o momento não existem medicamentos antivirais para o tratamento das infecções por RVA.

Além da TRO, outras medidas para o controle das GA de qualquer etiologia, destaca-se o aleitamento materno precoce e exclusivo até o sexto mês de vida, lavagem das mãos, consumo de água tratada, saneamento básico e tratamento adequado para crianças acometidas (WHO, 2013).

Melhorias nas condições sanitárias, assim como na destinação adequada dos dejetos humanos e animais, não são suficientes para o controle e prevenção das infecções por RVA. As infecções naturais não conferem proteção contra a reinfeção, e a prevenção desta doença nos dois primeiros anos de vida é fundamental para o desenvolvimento da criança. Desta forma, a vacinação contra RVA representa uma boa estratégia para evitar ou diminuir as formas mais severas da doença (Anderson, 2010).

A OMS, em 2009, recomendou a inclusão de vacinas contra RVA nos programas de imunização de todos os países, principalmente em países que as taxas de mortalidade são elevadas (WHO, 2009). Algumas vacinas já foram desenvolvidas e outras estão em desenvolvimento, entretanto, as vacinas RV1 e RV5 são indicadas em diversos países, incluindo o Brasil (O’Ryan et al., 2011).

A vacina RV1 é atenuada de origem humana, monovalente (G1P[8]) e de uso oral. No período experimental, nas fases II e III realizados na América Latina, incluindo o Brasil, envolveram em torno de 100 mil crianças e demonstraram proteção média de 85% contra GA grave e hospitalizações por RVA, além de mostrar eficácia na prevenção da GA de qualquer gravidade causada pelos genótipos G1 (92%), G3, G4 e G9 (88%). Quanto às internações por GA independente da etiologia, a RV1 mostrou proteção de 42% (Ruiz-Palacios et al., 2006). No Brasil, a RV1 foi introduzida no Programa de Imunização Nacional (PNI) em 2006, e foi denominada Vacina Oral de Rotavírus Humano (VORH), sua administração é dividida em duas doses, a primeira entre 6 e 14 semanas de vida, e a segunda entre 14 e 24 semanas, respeitando-se as faixas etárias preconizadas (Ministério da Saúde, 2006).

A vacina RV5 é composta por cepas de RVA geneticamente reestruturadas, de origem humana e bovina, e contemplando os genótipos G1, G2, G3, G4 e P[8], assumindo assim sua composição pentavalente. A administrada é por via oral, e dividida em três doses, a primeira entre 6-12 semanas e as subseqüentes a intervalos de 4 a 10 semanas, completando o esquema vacinal até o máximo de 32 semanas (Yen et al., 2011; WHO, 2013).

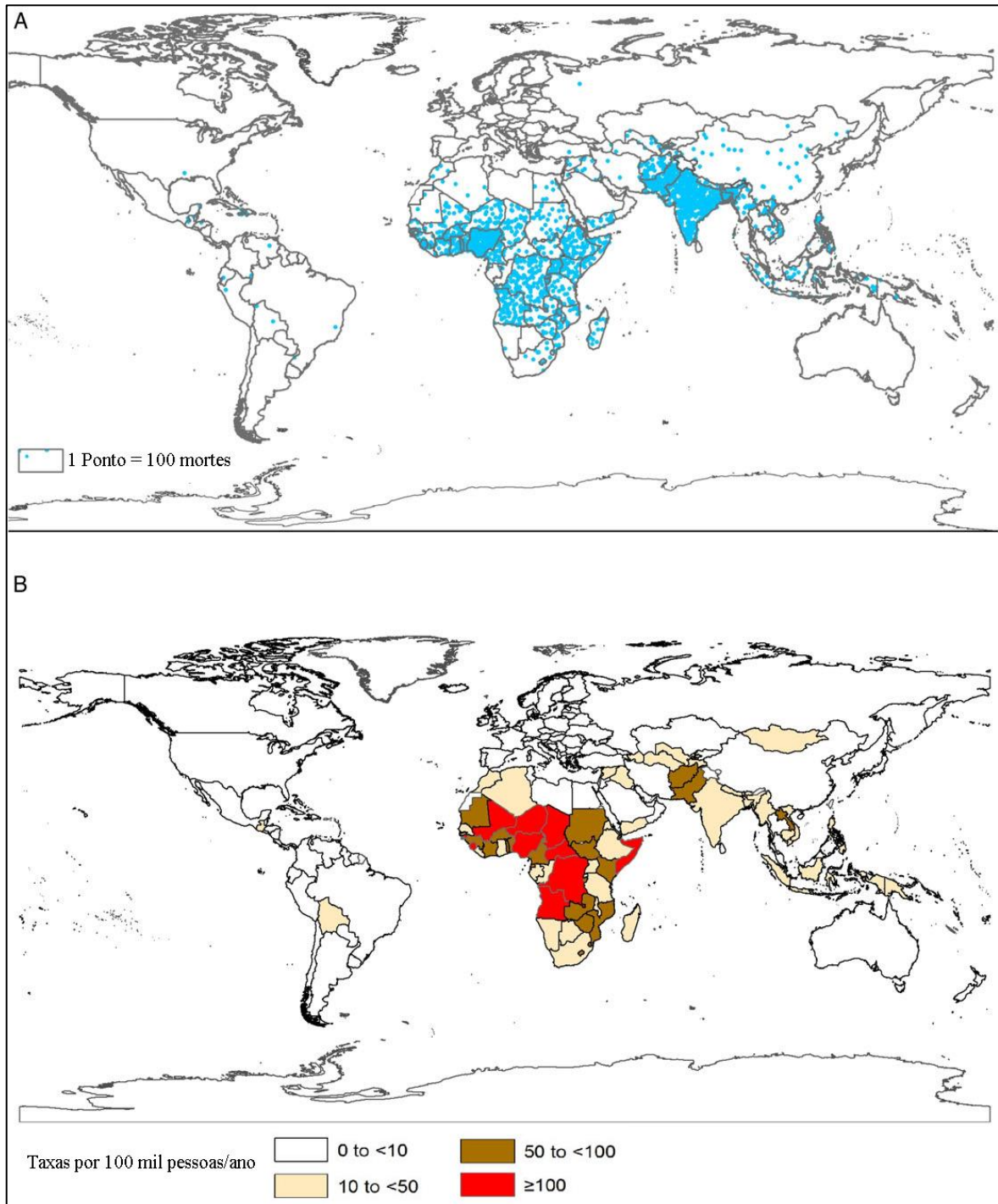
Um estudo realizado no Brasil demonstrou reduções no número de hospitalizações relacionadas com GA tanto nas regiões mais desenvolvidas (Sul e Sudeste) como nas regiões menos desenvolvidas (Norte e Nordeste) onde os indicadores socioeconômicos e de saúde se aproximam aos países em desenvolvimento (do Carmo et al., 2011) Quanto a introdução de RV5 no Brasil, a redução de hospitalizações foi significativa chegando a 93%, e estimativa de

redução anual de 42.991 e 77.383 nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (El Khoury et al., 2011).

2.10 Epidemiologia dos Rotavírus A

RVA é um dos principais agentes etiológicos da GA infantil e é responsável por aproximadamente 40% dos casos de diarreia em crianças com até 5 anos de idade, e 215 mil mortes por ano em todo o mundo. Países da África Sub-sariana e Índia, são os mais afetados apresentando taxas de morbidade e mortalidade ainda elevadas (**Figura 8**) (Tate et al., 2016).

FIGURA 8: Incidência de mortes por Rotavírus A (Adaptada de Tate et al., 2016).



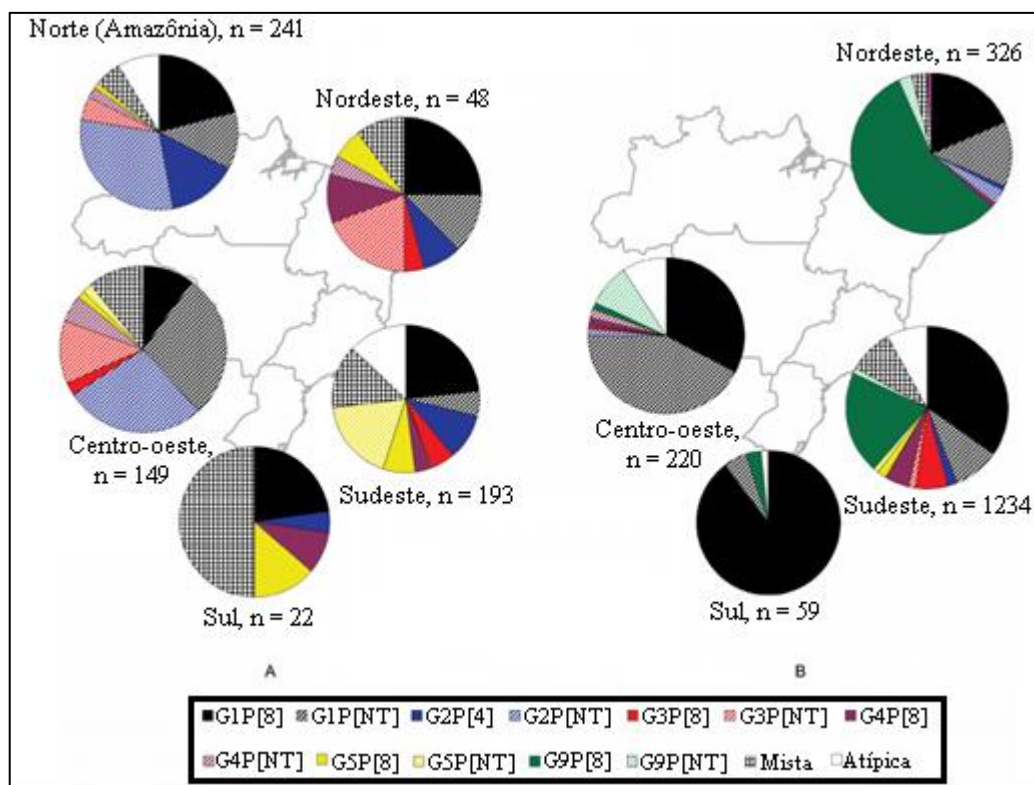
A: Número de mortes por Rotavírus A. B: Taxa de mortalidade de crianças < 5 anos de idade por país.

Mudanças nos padrões dos genótipos circulantes são observadas principalmente nos países em desenvolvimento, onde a re-emergência e emergência de novas cepas são frequentes devido a grande diversidade dos RVA (Vizzi et al., 2017). Embora diversas combinações de G e P tenham sido relatadas, os genótipos G1P[8], G2P[4], G3[P8], G4P[8], G9P[8] e G12P[8] são responsáveis por aproximadamente em todo o mundo (Santos e

Hoshino, 2005; Leite et al., 2008; Linhares et al., 2011; Banyai et al., 2012; Patton, 2012, Desselberger, 2014 e Ianiro et al., 2017).

No Brasil, Leite e colaboradores (2008) realizaram um estudo de revisão que relatava a detecção dos genótipos de RVA em circulação no período de 1982 a 2007. No período de 1982 a 1995, os genótipos G1 a G4 eram os mais prevalentes e o G5 foi observado em apenas 10% das amostras, e entre os anos 1996 a 2005, o genótipo G9 emergiu, a detecção de G5 foi reduzida e G2P[4] foi pouco detectado (**Figura 9**). E no período de 2006 a 2007, equivalente ao primeiro ano da implementação da vacina RV1, o genótipo G2P[4] reemergiu e se tornou o mais frequentemente detectado, com taxas de 74% nas amostras RVA positivas.

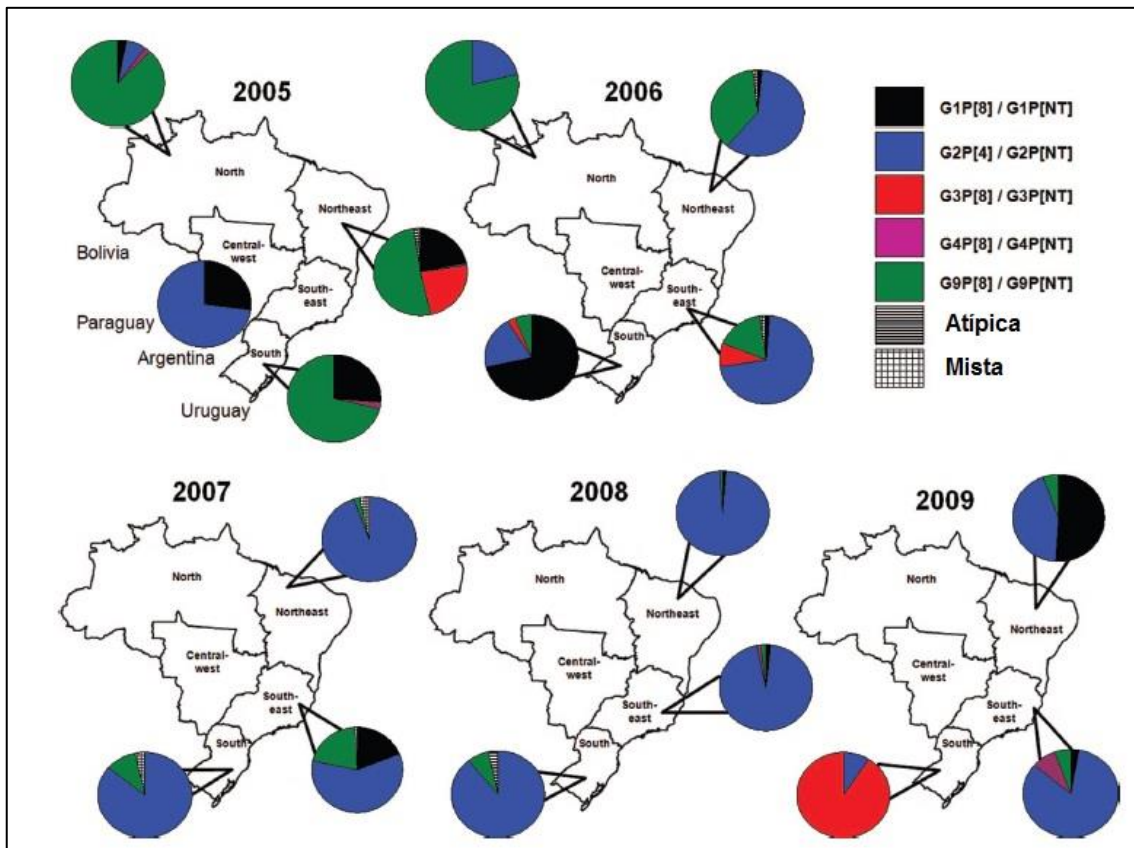
FIGURA 9: Distribuição dos genótipos de Rotavírus A no Brasil por região geográfica (Adaptada de Leite et al., 2008).



A: de 1982 a 1995; B: de 1996 a 2005

Carvalho-Costa e colaboradores (2011) descreveram a distribuição dos genótipos de RVA circulantes em diversas regiões do Brasil, no período de 2005 a 2009. Os genótipos G1P[8], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] foram confirmados como os principais genótipos detectados, e houve um importante aumento na detecção do genótipo G2P[4] entre os anos de 2006 e 2008 (**Figura 10**).

FIGURA 10: Distribuição dos genótipos de Rotavírus A no Brasil entre os anos de 2005 e 2009 (Adaptada de Carvalho-Costa et al., 2011).



O genótipo G2P[4] continuou prevalente nos anos 2008 e 2009 (Sá et al., 2015), mas entre os anos de 2010 e 2011 foi observado um aumento na circulação de cepas de RVA pertencentes ao genótipo G1P[8] em crianças (Guerra et al., 2015).

G1P[8] ainda é frequentemente detectado no Brasil, mesmo após a introdução da vacina RV1 no Programa Nacional de Imunização (PNI) em 2006 (Rose et al., 2013). Silva e colaboradores (2015) realizaram um estudo onde avaliavam a circulação de G1P[8] nos períodos pré e pós-vacinais, em crianças hospitalizadas, durante mais de 27 anos, e seus resultados mostram que há variação na detecção de G1P[8], mas entre os anos 1994-1995, 1997-1998, 2000-2004 e 2008-2009 ocorreram picos elevados de infecção por RVA pertencentes ao genótipo G1P[8].

O genótipo G3 é conhecido por sua grande diversidade e por ser capaz de infectar diferentes hospedeiros como humanos, porcos, coelhos, felinos, caninos, entre outros (Khamrin et al., 2009; Donato et al., 2014; Xia et al., 2014, Bonica et al., 2015; Mijatovic-Rustempasic et al., 2016). Sua detecção em humanos é comumente associada com o genótipo

P[8] e menos frequentemente com P[9] (Dóro et al., 2014). No Brasil, poucos estudos relatam a detecção da combinação do genótipo G3 com P[9] (Tsugawa et al., 2015; Bezerra et al., 2017). Outras combinações pouco detectadas são G1P[4] e G2P[8], mas no Brasil Carvalho-Costa e colaboradores (2011) e Guerra e colaboradores (2015) observaram a circulação destes genótipos.

No Brasil, atualmente, os genótipos detectados nas infecções por RVA com maior frequência são G12P[8] e G3P[8], principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste (Luchs et al., 2016, da Silva et al., 2017).

3 JUSTIFICATIVA

O RVA é um dos principais patógenos das GA infantil, sendo responsável por aproximadamente 40% dos casos de diarreia em crianças com até cinco anos de idade e 215.000 mortes por ano no mundo todo (Tate et al., 2016). Mudanças nos padrões dos genótipos circulantes de RVA são observadas frequentemente, principalmente nos países em desenvolvimento onde as condições socioeconômicas, sanitárias e de saúde ainda são precárias (Mohan et al., 2017; Vizzi et al., 2017).

O estudo coorte, multicêntrico, MAL-ED (The Etiology, Risk Factors, and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequence for Child Health and Development) mostra que RVA está entre os principais patógenos envolvidos nas GA, sendo diagnosticado nos primeiros anos de vida em crianças de comunidades carentes em oito países (Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal, Paquistão, Peru, África do Sul e Tanzânia) (Platts-Mills et al., 2015; Mohan et al., 2017).

No Brasil, há diversos estudos que mostram a prevalência de RVA e os principais genótipos em circulação (Leite et al., 2008; Carvalho-Costa et al., 2011; Rose et al., 2013; da Silva et al., 2015; Guerra et al., 2015; Sá et al., 2015; Luchs et al., 2016; da Silva et al., 2017), entretanto, estes resultados são provenientes de amostras de crianças hospitalizadas.

Apesar dos diversos estudos epidemiológicos no Brasil e no mundo, no âmbito hospitalar, sobre RVA, a pesquisa da circulação deste vírus, bem como dos genótipos, em comunidades, ainda é pouco estudada. Assim, estudos que verifiquem a presença do vírus e os genótipos em circulação são necessários para um melhor entendimento da epidemiologia dos RVA.

Em vista da importância das infecções de RVA na população infantil, a busca da compreensão do impacto deste patógeno nas comunidades carentes torna-se estritamente relevante, principalmente em regiões onde a vigilância epidemiologia é escassa como na região do semiárido brasileiro. Assim, o presente estudo analisou a presença de RVA nessas crianças, além de avaliar os genótipos circulantes e as características socioeconômicas, clínicas, antropométricas e a cobertura vacinal, contribuindo para o entendimento do impacto desse vírus nesta população.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização molecular e a análise filogenética dos genótipos circulantes de Rotavírus A em crianças com e sem diarreia no Semiárido Brasileiro.

4.2 Objetivos primários

- Determinar a prevalência de Rotavírus A em população infantil com e sem diarreia no Semiárido Brasileiro.
- Realizar a caracterização e análise filogenética baseada nos genes que codificam para VP8* e VP7 de cepas de Rotavírus A circulantes em crianças com e sem diarreia no Semiárido Brasileiro.

4.3 Objetivos secundários

- Associar a sintomatologia como: febre, dor abdominal, vômito, muco ou sangue nas fezes, entre outros, com as amostras positivas para Rotavírus A nas crianças com e sem diarreia no Semiárido Brasileiro.
- Identificar a presença de fatores determinantes para as gastroenterites agudas como aleitamento materno, idade das crianças, estado nutricional e renda mensal familiar nas famílias das crianças com rotavirose.
- Avaliar a prevalência de crianças vacinadas e associar com as amostras positivas e negativas para Rotavírus A.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Ética do estudo

Esse estudo faz parte de um projeto intitulado “Estudo da etiologia da diarreia infantil em crianças provenientes da comunidade urbana em Fortaleza, CE, Brasil, e do Semiárido Brasileiro – Sub-projeto 1” (Rede de Ovino Caprino Cultura e Diarreia Infantil no Semiárido Brasileiro - RECODISA), aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP – ANEXO A) e recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da UFC (COMEPE/UFC – ANEXO B). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – ANEXO C) foi revisado e aprovado pelo COMEPE/UFC (ANEXO B).

5.2 Caracterização da população.

O RECODISA é um estudo epidemiológico, transversal, analítico, caso/controle, realizado durante um período de 16 meses, de Setembro de 2009 a Março de 2011. A coleta de dados e amostras de fezes foi realizada entre os meses de Setembro a Março de 2010/2011 período de chuva e com maior incidência de casos diarreicos. O estudo foi realizado em seis cidades, Crato (CE), Picos (PI), Ouricuri (PE), Cajazeira (PB), Souza (PB) e Patos (PB) localizadas no Semiárido Brasileiro e com população superior a 50.000 habitantes cada (**Figura 11**). Foi composto por seis meses de coletas e 1200 crianças (200 crianças por cidade participante) na faixa etária entre 2-36 meses, onde 600 foram consideradas casos, quando a criança apresentava o quadro diarreico e, 600 controles, quando a criança não teve diarreia nos 14 dias anteriores à coleta.

FIGURA 11: Região do Semiárido Brasileiro.



Cidades do nordeste brasileiro: Crato (CE), Picos (PI), Ouricuri (PE), Cajazeiras (PB), Souza (PB) e Patos (PB).

Após entrevista com os participantes, foi realizado a assinatura do TCLE pelo responsável da criança e o preenchimento da ficha epidemiológica e dados antropométricos (ANEXO D). Os responsáveis receberam um pote de plástico estéril e foram orientados sobre o procedimento de coleta. Caso o espécime fecal não tivesse sido coletado, o grupo de campo retornava por mais 5 dias úteis consecutivos, quando a criança era, então, excluída do estudo por falta de material. As amostras coletadas eram armazenadas e enviadas em caixa térmica contendo gelo para o Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) da Unidade de Pesquisas Clínicas/ Instituto de Biomedicina (UPC/IBIMED), da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Para o diagnóstico de Rotavírus A, as amostras foram submetidas previamente ao método do Luminex, específica para o gene NSP3. Como resultados a detecção ocorreu em aproximadamente, 7,1% (86/1200) das crianças do RECODISA (**Tabela 2**).

TABELA 2: Prevalência de Rotavírus A em cidades do estudo.

Cidades do Estudo	Casos	Controles	Total
	Nº. %	Nº. %	Nº. %
Cajazeiras	11/100 (11%)	1/100 (1%)	12/200 (6%)
Crato	26/100 (26%)	20/100 (20%)	46/200 (23%)
Ouricuri	4/100 (4%)	1/100 (1%)	5/200 (2,5%)
Patos	4/100 (4%)	2/100 (2%)	6/200(3%)
Picos	8/100(8%)	6/100 (6%)	14/200 (7%)
Sousa	3/100 (3%)	0/100 (0%)	3/200 (1,5%)
Total	56/600 (9,33%)	30/600 (5%)	86/1200 (7,16%)

Para definição da população do estudo, foram selecionadas as 86 amostras positivas, e o dobro de amostras negativas para RVA, provenientes da mesma região na análise. Exemplo: a cidade de Crato apresentou 46 amostras positivas, portanto foram selecionados 92 controles, totalizando 138 amostras analisadas nesta cidade. No caso de uma cidade não atingir o número amostral de 25 (dentre casos e controles), mais amostras negativas para RVA eram adicionados até alcançar esse valor. No total foram analisadas as 86 amostras positivas para RVA pelo Luminex e mais 205 amostras negativas, chegando assim ao número final de 291 amostras (**Tabela 3**).

TABELA 3: Distribuição das amostras selecionadas dentro dos grupos positivos – negativos e caso – controle por cidade do estudo.

Cidades do estudo	Amostras positivas		Amostras negativas		Total
	Nº de casos	Nº de controles	Nº de casos	Nº de controles	
	Cajazeiras	11	1	22	2
Crato	26	20	52	40	138
Ouricuri	4	1	12	8	25
Patos	4	2	12	7	25
Picos	8	6	16	12	42
Sousa	3	0	14	8	25
Total	56	30	128	77	291

5.3 Extrações de RNA Fecal

5.3.1 Extração por Kit Comercial

A extração de RNA das fezes foi realizada após a suspensão fecal, onde eram adicionados 1mL de salina para 2 g de fezes. O kit *QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Valencia, Califórnia, EUA) preconiza a utilização de 140 mg da suspensão, e os reagentes e as quantidades eram de acordo com as instruções do fabricante.

Os RNAs obtidos foram mantidos a -80°C até o transporte e a realização do diagnóstico pelo método do LUMINEX e, posteriormente, foi realizada uma nova extração e enviados para a FIOCRUZ –Rio de Janeiro, para iniciar as análises através de PCR tempo real.

5.3.2 Extração pelo método de Boom

Foram preparadas suspensões fecais a 10% em tampão Tris-HCl Ca²⁺ 0,01M pH 7,2, homogeneizadas e centrifugadas a 3200 rpm por 30 minutos, posteriormente os sobrenadantes foram armazenados a -20°C. A partir das suspensões, as extrações do RNA genômico foram realizadas de acordo com o método já descrito por Boom e colaboradores (1990) com alterações segundo Leite e colaboradores (1996). Resumidamente: em um tubo tipo Eppendorf[®] de 1,5µL foi adicionado 400µL da suspensão fecal e 1mL de tampão L6, previamente preparados, seguido de 15µL de sílica, então as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos em agitação, após esse período foram centrifugadas por 60 segundos em velocidade máxima, e o sobrenadante foi descartado em solução de NaOH 10N. Em cada tubo, foi adicionado 1mL de tampão L2, também preparado previamente, seguido de agitação em vórtex para ressuspender o sedimento formado, foi recentrifugado utilizando os mesmo parâmetros de tempo e velocidade e o sobrenadante novamente foi desprezado em solução de NaOH 10N. A seguir foram feitas duas etapas de lavagem, na primeira foi adicionado 1mL de etanol a 70% e, na segunda, 1mL de acetona P.A (Merck[®]), ambos a 4°C e, realizando os mesmo procedimentos de homogeneização e sedimentação anteriormente descritos, e desprezando os sobrenadantes em solução de hipoclorito de sódio a 5%. Ao fim da última lavagem, os tubos passaram por duas incubações em banho maria a 56°C: durante 15 minutos com as tampas abertas para total evaporação da acetona, e após esse período, foram adicionados 60µL de água livre de endo e exonucleases (Invitrogen[®]) em cada tubo e incubados com tampas fechadas por mais 15 minutos. Por fim, as amostras foram

homogeneizadas por vórtex e centrifugadas em velocidade máxima por 3 minutos, assim o sobrenadante foi transferido para tubos tipo Eppendorf de 0,5µL e armazenados a -20°C ou -70°C.

5.4 Diagnóstico de Rotavírus A

5.4.1 Luminex

A metodologia do Luminex consiste basicamente na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) associada à hibridização com microesferas de poliestireno acopladas a sondas específicas para cada alvo. As referências para o protocolo de ciclagem, iniciados e sondas foram específicos para cada painel de patógenos e regiões alvos estão a seguir: vírus (Rotavírus, NSP3; Norovírus, ORF1-ORF2; Astrovírus, Capsid; Sapovírus, RdRp-capsid; Adenovírus, Hexon) (Liu J et al., 2011); *E. coli* enteropatogênicas; *E. coli* enteroagregativa, aaiC e aatA; *E. coli* enteropatogênica, bfpA e eaeA; *E. coli* enterotoxigênica, LT e ST; e *E. coli* enterohemorrágica, stx1, stx2 e eaeA) (Taniuchi et al., 2013); outras bactérias (*Shigella* spp, ipaH; *Salmonella* spp, invA; *Campylobacter* spp., cadF; *Aeromonas* spp, aerolysin e *Vibrio* spp, t toxR) (Liu J et al., 2012); protozoários (Giárdia spp, 18S rRNA; *Cryptosporidium* spp, COWP e *Entamoeba histolytica*, 18S rRNA) (Taniuchi et al., 2011). A detecção foi realizada por meio do equipamento Luminex Bio-Plex 200 System (Bio-Rad). A identificação por Luminex foi utilizada como diagnóstico inicial para realizar testes subsequentes.

5.4.2 Ensaio imunoenzimático para pesquisa de Rotavírus A

Com o objetivo de confirmar as amostras previamente positivadas, foi realizado o ensaio imunoenzimático (ELISA), através do kit Ridascreen[®], R-Biopharm A.G. seguindo as instruções do fabricante. E tendo como princípio a detecção de antígenos da proteína VP6 dos RVA.

5.4.3 Amplificação do gene NSP3 por PCR em Tempo Real

Com objetivo de realizar uma triagem para RVA dentro das 291 amostras do presente estudo, foi feito PCR em tempo real, conforme descrito por Fumian e colaboradores (2016). Foram utilizados iniciadores específicos para RVA, amplificando o gene NSP3 (**Tabela 4**). Controles negativos foram utilizados em todos os procedimentos desde a extração do RNA.

TABELA 4: Iniciadores e sonda utilizados para detecção de Rotavírus A.

Gene Alvo	Iniciadores / Sonda	Sequência 5' – 3'	Posição no genoma	Referência
NSP3	Iniciador F	ACC ATC TWC ACR TRA CCC TCT ATG AG	963-988	Zeng et al., 2008
	Iniciador R	GGT CAC ATA ACG CCC CTA TAG C	995-1017	
	Sonda	FAM- AGT TAA AAG CTA ACA CTG TCA AA -MGB	1028-1049	

Legenda: W – A/T; E – A/G

As amostras foram aplicadas em placas com 96 micropoços, contendo 5µL de RNA e 20µL da mistura (**Tabela 5**), obtendo um volume final de 25µL e, submetidas à temperatura inicial de 55°C durante 30 minutos para o processo de transcrição reversa, para a ativação da Taq polimerase foi submetido a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto, após a finalização o produto foi descartado, e os resultados coletados e analisados no Software Sequence Detector versão 1.6 (Applied Biosystems).

TABELA 5: Reagentes usados no PCR em Tempo Real para detecção de Rotavírus A.

Reagentes	Volume/Reação
H ₂ O livre de Dnase/Rnase	4,0 µL
PCR Master Mix	12,5 µL
ROX (1:10)	0,5 µL
RT SIII / Taq	0,5 µL
Primer NSP3F (10µM)	1,0 µL
Primer NSP3R (10µM)	1,0 µL
Probe NSP3P (10µM)	0,5 µL
Total	20 µL

5.4.4 Amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP6, VP4 (VP8*) e VP7 por RT-PCR

A amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP6, VP4 (VP8*) e VP7 foi realizada através da utilização do Kit Qiagen OneStep RT-PCR de acordo com as instruções descrita pelo fabricante. As misturas dos reagentes são iguais para todos os genes, e os iniciadores são específicos. Na **Tabela 6** está descrito as quantidades usadas para cada reação, bem como cada iniciador.

As reações eram feitas inicialmente para o gene que codifica a proteína VP6, e quando obtido resultado positivo, as reações dos genes que codificam para as proteínas VP4 (VP8*) e VP7 eram realizadas.

TABELA 6: Reagentes usados no RT-PCR para amplificação dos genes que codificam para VP6, VP4 (VP8*) e VP7.

Gene Alvo	Reagentes	Volume/Reação
VP6; VP4 (VP8*) e VP7	H ₂ O livre de Dnase/Rnase	10,0 µL
	5X Buffer	5,0 µL
	dNTP (200U/µL)	1,0 µL
	Primer VP6F (+); 4con3; Beg9 (20 µM)	1,0 µL
	Primer VP6R (-); 4con2; End9 (20 µM)	1,0 µL
	OneStep RT-PCR enzyme	1,0 µL
Total		19 µL

Em um tubo, tipo Eppendorf[®] de 200µL, foram adicionados 1µL de dimetil sulfóxido (DMSO) e 5µL do RNA extraído. Inicialmente foi incubado a 97°C por 5 minutos para desnaturação, logo em seguida colocado em banho de gelo por 2 minutos. A seguir foram adicionados mais 19µL da mistura dos reagentes (**Tabela 6**) contendo os iniciadores respectivos para cada gene, para a reação de amplificação. Controles negativos foram utilizados em todos os procedimentos desde a extração do RNA. Os iniciadores usados nas reações estão descritos na **Tabela 7**.

TABELA 7: Iniciadores usados nas reações de RT-PCR dos genes que codificam para VP6, VP4 (VP8*) e VP7.

Gene Alvo	Iniciadores	Sequência 5' – 3'	Posição no genoma	Referência
VP6	VP6-F (+) (20 µM)	GAC GGV GCR ACT ACA TGG T	747 - 766	Ituttiza- Gómara et al., 2002
	VP6-R (-) (20 µM)	GTC CAA TTC ATN CCT GGT GG	1126 - 1106	
VP4 (VP8*)	4con3 (+) (20 µM)	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	11 - 32	Gentsch et al., 1992
	4 con 2 (-) (20 µM)	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	887 – 868	
VP7	Beg9 (+) (20 µM)	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	1 - 28	Gouvea et al., 1990
	End9 (-) (20 µM)	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	1062 - 1036	

As condições de termociclagem consistiram em: uma etapa de RT a 50°C por 30 minutos; uma etapa de desnaturação a 95°C durante 15 minutos; 40 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos na etapa de desnaturação, 46°C por 30 segundos na etapa de hibridização dos iniciadores e 72°C por 1 minuto na etapa de extensão das fitas de DNA. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos.

5.5 Análise por eletroforese em gel de agarose a 2%

Para a análise dos *amplicons* obtidos nos testes realizados anteriormente, foi adicionado 2µL de Blue Green loading dye® (Axygen) em 10 µL de produto da RT-PCR e os mesmos foram aplicados em gel de agarose a 2% com brometo de etídio em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5% durante 1 hora e 20 minutos a 100 Volts. Após a eletroforese, o gel foi submetido ao transiluminador de luz ultravioleta (DyNA Light Dual Intensity UV; Labnet National Company) para visualização dos *amplicons* e as imagens foram registradas através

do sistema de captura de imagem Kodak Gel Logic 212. Controles negativos foram utilizados durante todos os procedimentos desde a extração de RNA.

5.6 Purificação dos produtos amplificados de Rotavírus A para sequenciamento

A purificação dos produtos amplificados de RVA foi realizada através da utilização de *kit* comercial “QIAquick[®] PCR Purification Kit” (QIAGEN[™], CA, USA), seguindo as instruções do fabricante e somente quando a banda esperada foi obtida.

5.7 Sequenciamento dos genes amplificados de Rotavírus A

O sequenciamento foi realizado pela Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/Fiocruz. De acordo com as orientações da plataforma, foram adicionados de 100 a 250 picomoles de DNA purificado e 3,2 picomoles dos iniciadores utilizados na PCR em tubos de 1,5 mL. A reação foi realizada utilizando o Kit Big Dye Terminator[®] v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems[®], CA, USA), conforme as instruções do fabricante.

Os cromatogramas das sequências foram obtidos a partir do sequenciador automático de 48 capilares “ABI Prism 3730 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) do serviço da “Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ”.

Os iniciadores utilizados no sequenciamento foram os mesmos das reações de amplificação, porém individualmente.

5.8 Análise das sequências

As sequências obtidas foram editadas e alinhadas usando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.6. Os protótipos utilizados neste estudo foram obtidos a partir do *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) através da ferramenta “Blast”.

Para as análises filogenéticas, foi utilizado o programa MEGA7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) e foram incluídas sequências nucleotídicas do *GenBank* que apresentaram similaridade maior que 95%, de acordo com a ferramenta do pacote *Blast*. As distâncias calculadas entre as sequências foram analisadas utilizando-se o algoritmo de Neighbor-Joining. A re-amostragem (*bootstrap*) aplicada foi de 2.000 repetições (KUMAR et al., 2016).

5.9 Análise Estatística

As análises estatísticas dos dados antropométricos, estado de aleitamento materno, e as condições clínicas entre as amostras positivas e negativas e a definição de caso/controle foram realizadas através dos testes Qui-quadrado, teste exato de Fisher e Odds Ratio (OR). Para a realização dos testes o Pacote Estatístico para Ciências Sociais (SPSS), versão 22 (IBM Corp, EUA) foi utilizado, e foi considerado *P*-valores de $< 0,05$ estatisticamente significantes.

6 RESULTADOS

6.1 Detecção e epidemiologia dos Rotavírus A

As 291 amostras selecionadas, foram submetidas à técnica de PCR tempo real, usando como gene alvo NSP3. Além da confirmação por qRT-PCR, onde as 86 amostras positivas para RVA foram testadas por ELISA, e apenas 5,8% foram confirmadas.

A detecção de RVA pelo qRT-PCR foi de 31/291 (10,65%), onde dentre as positivas aproximadamente 19,35% eram controles (6/31) e 80,64% eram casos (25/31). A cidade de Crato apresentou significância estatística com $P=0,0067$. Também foi encontrada significância estatística na distribuição de RVA em todas as cidades com um $P= 0,0472$ (Tabela 8).

TABELA 8: Distribuição de Rotavírus A por cidade do estudo em relação ao grupo caso e controle.

Cidades do Estudo	Casos	Controles	Total	P valor ($<0,05$)
	Nº. %	Nº. %	Nº. %	
Cajazeiras	7/33 (21,2%)	0/3 (0%)	7/36 (19,4%)	1,0000
Crato	12/78 (15,4%)	1/60 (1,7%)	13/138 (9,4%)	0,0067*
Ouricuri	1/16 (6,2%)	0/9 (0%)	1/25 (4%)	1,0000
Patos	2/16 (12,5%)	1/9 (11,1%)	3/25 (12%)	1,0000
Picos	2/24 (8,3%)	4/18 (22,2%)	6/42 (14,3%)	0,3752
Sousa	1/17 (5,9%)	0/8 (0%)	1/25 (4%)	1,0000
Total	25/184 (13,6%)	6/107 (5,6%)	31/291 (10,65%)	0,0472*

* P valor obtido por teste exato de Fisher ($<0,05$ significante).

Em relação ao sexo, das 291 crianças selecionadas, 147 eram do sexo masculino e 144 do sexo feminino, e dentre as positivas para RVA 71% (22/31) corresponderam ao gênero masculino, com significância estatística em relação os casos positivos, com $P= 0,0216$ e Odds Ratio de 2,640, IC 95% = 1.171 a 5.952. Dentre as idades, o maior número de casos de RVA ocorreu entre as crianças de 0 - 12 meses (22/31 – 71%), seguido pela idade de 12.1 – 24

meses (6/31 – 19,3%) e 24.1 – 36 meses (3/31- 9,7%). Foi apresentando significância relacionada com a ausência de RVA nas idades de 0 – 12 meses ($P = 0,0001$) e 24.1 – 36 meses ($P = 0,0190$) (**Tabela 9**).

Quanto à vacinação, 96,8% das crianças que tiveram diagnóstico positivo para RVA, receberam a primeira dose da vacina aos dois meses de vida e, 60,3% receberam a segunda dose da vacina aos quatro meses de vida. Já as amostras que foram negativas para RVA, 100% receberam a primeira dose da vacina e, 92,7% receberam a segunda dose. Foi observado que houve significância estatística de $P = 0,0001$ e Odds Ratio de 0,1183, IC 95% = 0.04968 a 0.2815 em relação à segunda dose da vacina (**Tabela 9**).

A amamentação parcial (onde a criança foi amamentada por alguns meses (1-6 meses)) foi relatada em 35,5% (11/31) das crianças positivas para RVA, seguido por amamentação não exclusiva com 32,25% (10/31), amamentação exclusiva com 29% (9/31) e crianças que nunca foram amamentadas com 3,25% (1/31). Significância estatística foi observada na amamentação exclusiva associada aos casos negativos de RVA, com $p = 0,0012$, risco relativo de 0,5816, IC 95% = 0.2840 a 1.191. Quanto à renda familiar mensal, 8,2% (24/291) das famílias relataram receber menos que dois salários mínimos e não foi observado significância (**Tabela 9**).

TABELA 9: Caracterização da população infantil positiva para Rotavírus A do Semiárido Brasileiro.

Parâmetros	Total N = 291 (%)	Positivo RVA N = 31 (%)	Negativo RVA N = 260 (%)	P (<0,05)
Gênero				
Masculino	147 (50,5%)	22 (71%)	125 (48,1%)	0,0216*
Feminino	144 (49,5%)	9 (29%)	135 (51,9%)	
Idade				
0 – 12 meses	111 (38,1%)	22 (71%)	89 (34,3%)	0,0001*
12,1 – 24 meses	101 (34,7%)	6 (19,3%)	95 (36,5%)	0,0719
24,1 – 36 meses	79 (27,2%)	3 (9,7%)	76 (29,2%)	0,0190*
Vacinação				
1ª Dose (2 meses)	290 (99,7%)	30 (96,8%)	260 (100%)	0,1065
2ª dose (4 meses)	260 (89,3%)	19 (60,3%)	241 (92,7%)	0,0001*
Amamentação				
Exclusiva	29 (10%)	9 (29%)	20 (7,7%)	0,0012*
Não Exclusiva	129 (44,3%)	10 (32,25%)	119 (45,8%)	0,1807
Parcial ¹	118 (40,5%)	11 (35,5%)	107 (41,1%)	0,5691
Não ²	15 (5,2%)	1 (3,25%)	14 (5,4%)	1,0000
Renda familiar mensal (em salários mínimos)				
≤ 2	256 (88%)	24 (77,4%)	232 (89,2%)	0,0750
2 ≤ 5	35 (12%)	7 (22,6%)	28 (10,8%)	0,0690

1- Amamentação Parcial: crianças que foram amamentadas por alguns meses (1-6 meses); 2- Não: crianças que nunca foram amamentadas; *- P valor obtido por teste exato de Fisher (<0,05 significante).

6.2 Dados clínicos e antropométricos da população

Dentre os sintomas relatados, o mais relevante foi diarreia com 80,7% (25/31) (P= 0,0472) das crianças com rotavirose. Além disso, 19,3% (6/31) das crianças que apresentavam positividade para RVA eram assintomáticas.

Em relação aos outros sintomas clínicos, febre foi o segundo mais relatado relacionado a presença de RVA, correspondendo a 35,5% (11/31), seguido de vômito em 29% (9/31).

Visto entre todos os sintomas, o único a apresentar significância estatística foi diarreia associada a presença de RVA. Uma limitação do estudo foi que alguns responsáveis não souberam responder se a criança apresentava ou não tais sintomas. Todos os sinais e sintomas analisados estão apresentados na **Tabela 10**.

TABELA 10: Sintomatologia clínica relatada pelos responsáveis pelas crianças com amostra positiva para Rotavírus A.

Dados Clínicos	Total	Positivo RVA	Negativo RVA	P valor
	% (n pos/n total)	% (n pos/n total)	% (n pos/n total)	(<0,05)
Diarreia	(184/291)	80,6 (25/31)	61,1 (159/260)	0,0472*
Febre	(55/189)	35,4 (11/31)	27,8 (44/158)	0,1073
Dor abdominal	(26/189)	6,5 (2/31)	15,2 (24/158)	0,5380
Sangue nas fezes	(1/189)	0 (0/31)	0,6 (1/158)	1,0000
Muco nas fezes	(16/188)	9,7 (3/31)	8,3 (13/157)	0,4501
Vômito	(53/189)	29 (9/31)	27,8 (44/158)	0,4771
Tosse ou sintomas respiratórios	(57/189)	22,6 (7/31)	31,6 (50/158)	0,8188
Fraqueza	(37/189)	12,9 (4/31)	20,9 (33/158)	0,7893
Inquietação	(49/189)	16,1 (5/31)	27,8 (44/158)	0,4760

* P valor obtido por teste exato de Fisher (<0,05 significantes).

De acordo com os dados antropométricos não houve alterações no estado nutricional em relação à presença ou ausência de RVA na população infantil do presente estudo, entretanto 80,7% das amostras positivas para RVA eram em crianças com bom estado nutricional (**Tabela 11**).

TABELA 11: Dados antropométricos das crianças com e sem Rotavírus A.

Dados	Total	Positivo RVA	Negativo RVA	P valor
Antropométricos	N = 291	N = 31	N = 260	<0,05
HAZ ¹ (Média ± DP)	-0,2359 ± 1,690	0,3384 ± 1,435	-0,2236 ± 1,720	0,7015
WAZ ² (Média ± DP)	0,3200 ± 1,424	0,2419 ± 1,450	0,3294 ± 1,423	0,5718
WHZ ³ (Média ± DP)	0,6151 ± 1,604	0,6119 ± 2,124	0,6154 ± 1,535	0,9627
BAZ ⁴ (Média ± DP)	0,7058 ± 1,955	0,6229 ± 2,152	0,7158 ± 1,934	0,8422

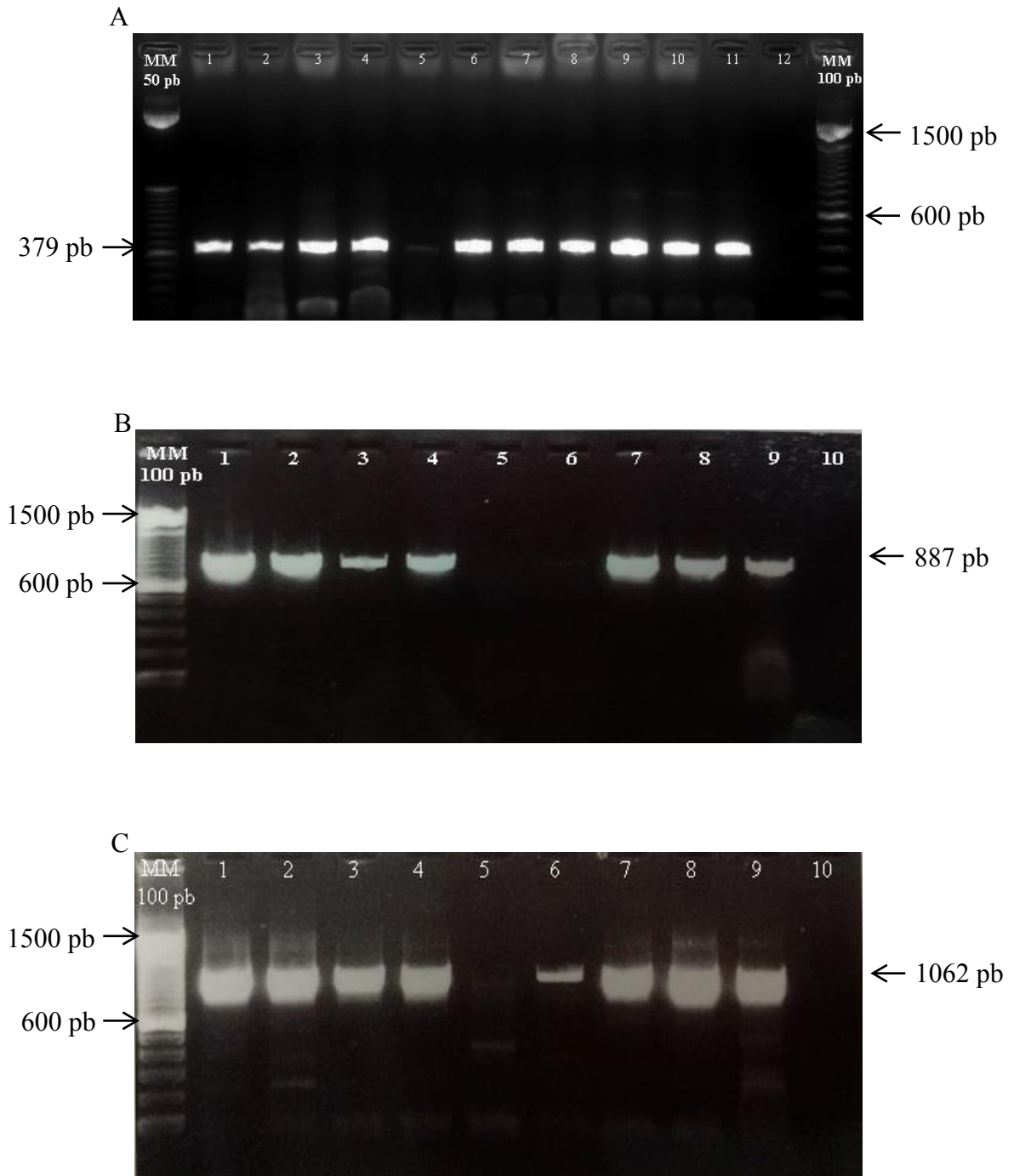
1 HAZ – Height-for-age Z-score (Z-score de altura por idade); 2 WAZ – Weight-for-age Z-score (Z-score de peso por idade); 3 WHZ – Weight-for-height Z-score (Z-score peso por altura); 4 BAZ – BMI-for-age Z-score (Z-score de índice de massa corpórea por idade).

6.3 Amplificação dos genes que codificam para VP6, VP4 (VP8*) e VP7 para análise por sequenciamento.

Das 31 amostras positivas para RVA pela técnica de PCR em tempo real, 67,7% (21/31) foram amplificadas para o gene que codifica a proteína VP6. Desta forma, as amostras que foram positivas para VP6 foram amplificadas para os genes que codificam as proteínas VP4 (VP8*) em 85,7% (18/21) e VP7 em 80,9% (17/21) e posteriormente sequenciadas. A **Figura 12** representa a análise por eletroforese em gel de agarose da amplificação destes genes.

Após genotipagem as amostras deste estudo foram caracterizadas como pertencentes aos genótipos G1, G2 e G3 e P[4], P[8] e P[9] para os genes que codificam para as proteínas VP7 e VP4 (VP8*), respectivamente. Não foi possível identificar os genótipos (G?P[?]) de uma amostra dentre as 21 positivas para o gene que codifica para a proteína VP6. Sendo G1P[8] a combinação mais frequente (57%). Combinações atípicas também foram encontradas, como G1P[4], G2[P8] e G3P[9].

FIGURA 12: Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de RT-PCR para os genes que codificam as proteínas VP6 (A), VP4 (VP8*) (B) e VP7 (C) de Rotavírus A.



MM: marcador molecular de 50 ou 100 pb. **A:** Linhas 1 a 10 amostras positivas que amplificaram para o gene que codifica para a proteína VP6, linha 11 controle positivo para RVA e linha 12 controle negativo; **B:** Linhas 1 a 4, 6 a 8 amostras positivas que amplificaram para o gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*), linha 5 amostra negativa para a amplificação do gene VP4, linha 9 controle positivo para RVA e linha 10 controle negativo; **C:** Linhas 1 a 4, 6 a 8 amostras positivas que amplificaram para o gene que codifica a proteína VP7, linha 5 amostra negativa para a amplificação do gene VP7, linha 9 controle positivo para RVA e linha 10 controle negativo.

6.4 Análise filogenética

As árvores filogenéticas foram construídas utilizando sequências nucleotídicas dos genes que codificam para as proteínas VP4 (VP8*) e VP7. Para a análise comparativa foram incluídas amostras protótipos, equivalentes aos genótipos encontrados, no Brasil e no mundo, disponíveis no *GenBank*.

6.4.1 Análise do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*)

A **Figura 13** representa a análise filogenética baseada na sequência nucleotídica parcial (887 pb) do gene que codifica para a proteína VP8*.

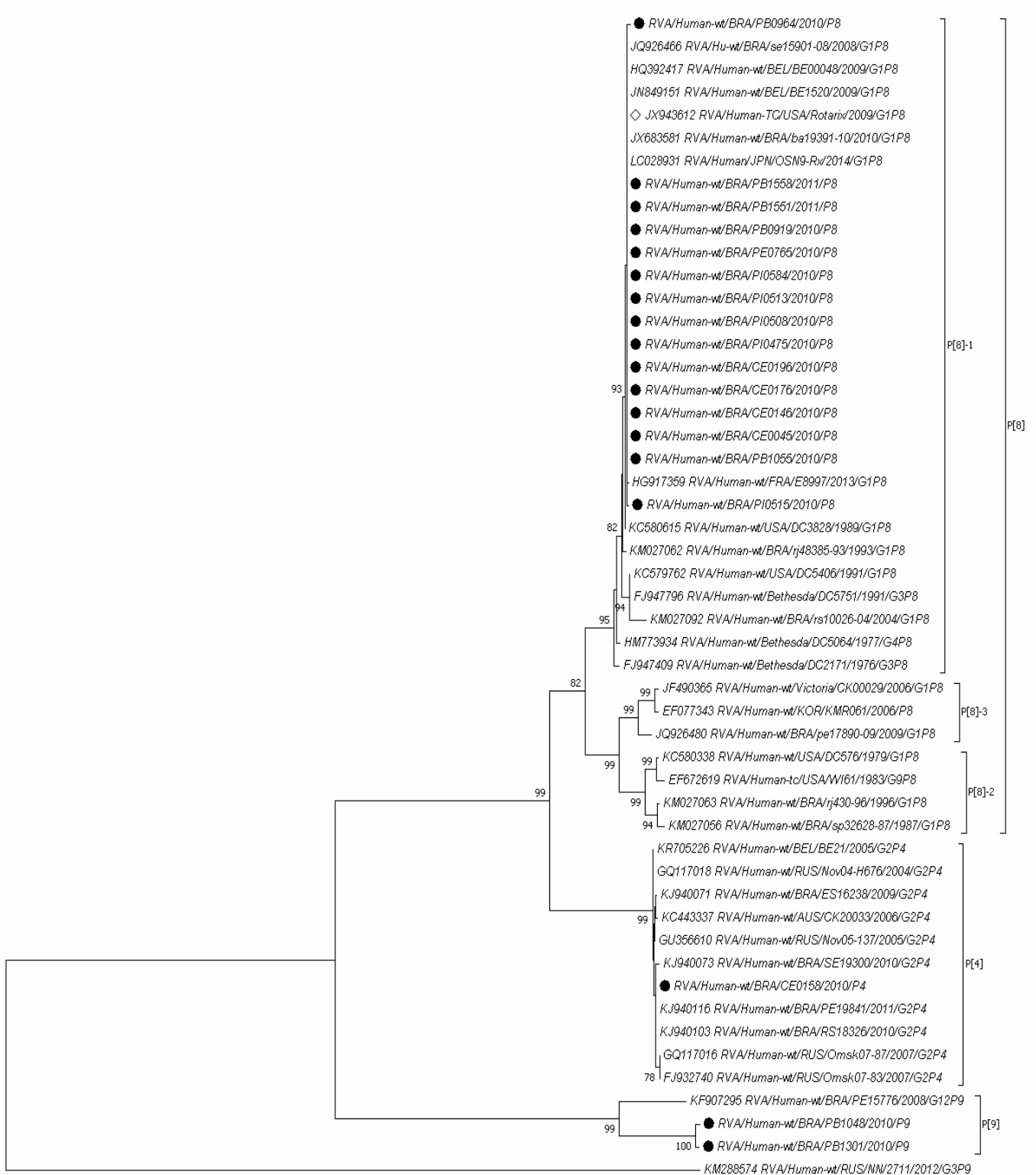
Através da análise filogenética, foi possível determinar que as amostras genotipadas como P[8] deste estudo, pertencem a linhagem P[8]-1, e apresentam valores de identidade nucleotídica de 98% a 100% com a vacina RV1 (RVA/Human-TC/USA/Rotarix/2009/G1P8 - JX943612) (**Figura 14**).

No *cluster* referente ao genótipo P[8], as amostras deste estudo, isoladas entre os anos de 2010 e 2011, agrupam-se com amostras coletadas entre 1987 e 2011, encontradas nas regiões Nordeste (Bahia, Pernambuco e Sergipe), Sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Rio Grande do Sul). Neste grupo, também foram encontradas amostras de outros países, como Austrália, Bélgica, Coreia do Sul, Estados Unidos da América, França e Japão entre os anos 1976 e 2014 (**Figura 13**).

Apenas uma amostra foi genotipada como P[4] e isolada no ano de 2010, no Estado do Ceará e agrupou com outras amostras brasileiras provenientes da região Nordeste (Pernambuco e Sergipe) nos anos de 2010 e 2011, Sudeste (Espírito Santo) em 2009 e Sul (Rio Grande do Sul) em 2010. Amostras provenientes de outros países também foram agrupadas no mesmo *cluster*, como Austrália (2006), Bélgica (2005) e Rússia (2005 e 2007) (**Figura 13**).

As amostras genotipadas como P[9] foram isoladas em 2010 no Estado da Paraíba e agrupam-se com uma amostra Brasileira do Estado de Pernambuco, na região Nordeste e isolada no ano de 2008. A amostra proveniente da Rússia, isolada em 2012 foi agrupada no mesmo *cluster* (**Figura 13**).

FIGURA 13: Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica parcial (887 pb) do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) de amostras de Rotavírus A.



Amostras provenientes dos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Piauí, coletadas de maio de 2010 a março de 2011 (círculo preenchido) e protótipos de diferentes tipos de genótipos humanos

FIGURA 14: Identidade nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) entre amostras dos Estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Piauí e amostra da vacina RV1 (RVA/Human-TC/USA/Rotarix/2009/G1P8 - JX943612).

Amostras	Rotarix	CE0045	CE0146	CE0176	CE0196	PI0475	PI0508	PI0513	PI0515	PI0584	PE0765	PB0919	PB0964	PB1055	PB1551	PB1558
RVA/human-tc/USA/Rotarix/2009/G1P8]	ID															
RVA/Human-wt/BRA/CE0045/2010/P[8]	100% ID															
RVA/Human-wt/BRA/CE0146/2010/P[8]	100%	100% ID														
RVA/Human-wt/BRA/CE0176/2010/P[8]	100%	100%	100% ID													
RVA/Human-wt/BRA/CE0196/2010/P[8]	99%	99%	99%	99% ID												
RVA/Human-wt/BRA/PI0475/2010/P[8]	100%	100%	100%	100%	99% ID											
RVA/Human-wt/BRA/PI0508/2010/P[8]	100%	100%	100%	100%	99%	100% ID										
RVA/Human-wt/BRA/PI0513/2010/P[8]	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100% ID									
RVA/Human-wt/BRA/PI0515/2010/P[8]	100%	100%	100%	100%	98%	100%	100%	100% ID								
RVA/Human-wt/BRA/PI0584/2010/P[8]	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100% ID							
RVA/Human-wt/BRA/PE0765/2010/P[8]	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100% ID						
RVA/Human-wt/BRA/PB0919/2010/P[8]	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	100%	100% ID					
RVA/Human-wt/BRA/PB0964/2010/P[8]	100%	100%	99%	100%	98%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	100% ID				
RVA/Human-wt/BRA/PB1055/2010/P[8]	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99% ID			
RVA/Human-wt/BRA/PB1551/2011/P[8]	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100% ID		
RVA/Human-wt/BRA/PB1558/2011/P[8]	100%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100% ID	

6.4.2 Análise do gene que codifica para a proteína VP7

Após a análise das sequências obtidas a partir do gene de VP7 das amostras deste estudo, foi possível caracterizá-las como pertencentes aos genótipos G1 (14/16), G2 (1/16) e G3 (1/16). Na **Figura 15** podemos observar a análise filogenética baseada na sequência nucleotídica completa (1062 pb) do gene que codifica para a proteína VP7.

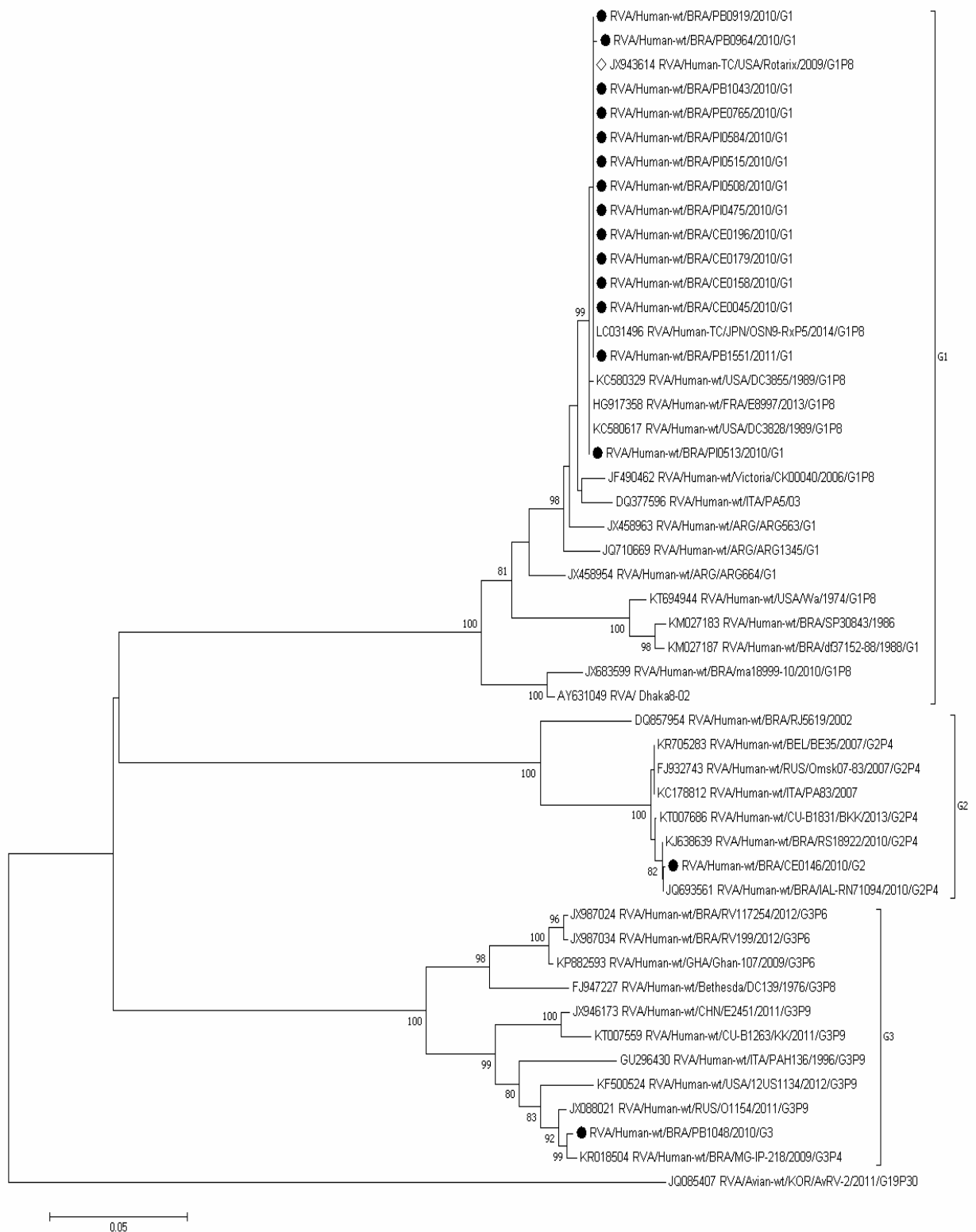
O *cluster* referente às amostras com genótipos G1 provenientes dos Estados de Ceará, Paraíba, Pernambuco e Piauí, detectados nos anos de 2010 e 2011, foram agrupados com amostras das regiões Nordeste (Maranhão) em 2010, Centro-Oeste (Distrito Federal – Brasília) em 1988 e Sudeste (São Paulo) em 1896. Amostras de outros países como Argentina (1980,1990 e 2000), Austrália (2006), Bangladesh (2002), Estados Unidos da América (1974, 1989 e 2009), França (2013), Itália (2003) e Japão (2014) também foram agrupadas neste *cluster*. A vacina RV1 (RVA/Human-TC/USA/Rotarix/2009/G1P8 - JX943612) foi agrupada junto com as amostras deste estudo (**Figura 15**).

A amostra pertencente ao genótipo G2 foi detectada no Estado do Ceará no ano de 2010 e foi agrupada com amostras das regiões Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul), Sudeste (Rio de Janeiro) e Sul (Rio Grande do Sul) do Brasil, nos anos 2010, 2002 e 2010,

respectivamente. Amostras originárias de outros países também foram agrupadas ao *cluster* de G2, como Bélgica, Itália e Rússia, ambas no ano de 2007 (**Figura 15**).

O genótipo G3 foi detectado em uma amostra do Estado da Paraíba em 2010 e foi agrupada com amostras brasileiras da região Norte em 2012 e outra amostra do Estado de Minas Gerais em 2009. As amostras da China (2011), Estados Unidos da América (1976 e 2012), Gana (2009), Itália (1996), Rússia (2011) e Tailândia (2011) também foram incluídas no *cluster* do genótipo G3 (**Figura 15**).

FIGURA 15: Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica completa (1062 pb) do gene que codifica para a proteína VP7 de amostras de Rotavírus A.



Amostras provenientes dos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Piauí, coletadas de maio de 2010 a fevereiro de 2011 (círculo preenchido) e protótipos de diferentes tipos de genótipos humanos.

7 DISCUSSÃO

A GA viral continua sendo um importante problema de saúde pública mundial e é caracterizada pela manifestação de sintomas como dor abdominal, diarreia, náusea, vômitos e febre, principalmente em crianças abaixo de 5 anos de idade (WHO, 2013). Dentre os agentes etiológicos que induzem GA viral, o RVA é um dos principais patógenos, entretanto após a introdução de uma vacina anti-RVA no programa nacional de imunização de diversos países as taxas de mortalidade decaíram, contudo as taxas de morbidade continuam elevadas principalmente nos países em desenvolvimento (Costa et al., 2016; Tate et al., 2016).

No presente estudo, a prevalência de RVA em crianças de 2-36 meses de idade, oriundas de comunidades carentes do Semiárido Brasileiro, foi de 10,65 % pela técnica de qRT-PCR. Outros estudos vêm sendo realizados em diversas regiões do Brasil, tanto em crianças hospitalizadas como em emergências, e mostram uma prevalência para RVA de 12% em Fortaleza, Ceará (Sá et al., 2015), 11% em Aracaju, Sergipe (Gurgel et al., 2009), 15% em Recife, Pernambuco (Nakagomi et al., 2008) ambos na região Nordeste; 9,6% em Rio Branco, Acre (Neves et al., 2016), 17,2% em Belém, Pará (Guerra et al., 2015), ambos na região Norte; e nas regiões Centro-Oeste (Góias, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Sudeste (São Paulo) e Sul (Paraná) aproxima-se de 19,7% nos anos 2012-2014 (Luchs et al., 2016). Os dados de detecção do atual trabalho corroboram com as taxas dos estudos citados anteriormente, contudo este é primeiro relato de RVA na região do Semiárido Brasileiro em um estudo caso – controle.

Nas cidades deste estudo, foi observada uma grande variação na detecção de RVA entre 4% e 19,4%. Sousa e Ouricuri apresentaram as menores taxas de detecção e Cajazeiras a maior. Em estudos de coorte, multicêntricos, Platts-Mills e colaboradores (2015) e Mohan e colaboradores (2017) observaram taxas similares, 4,9% e 3,1%, respectivamente, na detecção de RVA em crianças desnutridas de comunidades carentes provenientes de 8 países (Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal, Paquistão, Peru, África do Sul e Tanzânia).

Em relação ao gênero da população infantil do presente estudo, 71% das amostras positivas para RVA, apresentou associação com o sexo masculino. Outros estudos de perfil epidemiológico nacionais também apresentaram o mesmo relato (Guerra et al., 2015; Luchs et al., 2016; Neves et al., 2016), contudo não há relação significativa entre a detecção de RVA e o gênero.

Como parte do referido estudo (MAL-ED) Mohan e colaboradores (2017) realizaram a análise de amostras fecais de crianças entre 17 dias e 24 meses de vida e observaram que a incidência de RVA, tanto no primeiro ano de vida quanto no segundo, apresentam taxas elevadas em diversos países, principalmente naqueles onde não oferecem a vacinação pelos programas de imunização. Vizzi e colaboradores (2017) ao detectar RVA em amostras de crianças entre os anos de 2007-2008, também observou que a faixa etária mais acometida era crianças menores de dois anos de idade. Corroborando com estes dados, o grupo mais acometido por RVA, no presente estudo, em relação à idade, foram crianças entre 0-12 meses (71%), seguido de 12,1-24 meses (19,3%) e 24,1-36 meses (9,7%).

Em contrapartida, observa-se que após a introdução da vacina anti-RVA, houve uma mudança na faixa etária das crianças acometidas por RVA, e a observação global é de que o RVA é um dos principais agente etiológicos das GA em crianças menores de 5 anos de idade (CDC, 2011). Corroborando com essa mudança, estudos nacionais que avaliavam a presença de RVA em crianças de 0 a 10 anos, entre outras idades e entre os anos de 2012-2014, observaram que as maiores taxas de detecção de RVA eram em crianças de 2 a 5 anos de vida (Luchs et al., 2016; da Silva et al., 2017).

No Brasil, a vacina RV1 (Rotarix[®]) foi introduzida no Programa Nacional de Imunização (PNI) em 2006, e preconiza a administração da vacina em duas doses, a primeira em crianças com 2 meses e a segunda em crianças com 4 meses de vida (Ministério da Saúde, 2006). Entre os anos de 2006-2011 a cobertura vacinal aumentou consideravelmente, chegando a 87,06% em todo o país (Linhares & Justino, 2014).

No presente estudo, foi observada uma ampla cobertura vacinal, onde 99,7% das crianças receberam a primeira dose da vacina e, apesar de uma taxa menor, mas ainda significativa, 89,3% receberam a segunda dose, e foi relacionado significativamente com a ausência de RVA na população. Esta diminuição da taxa na segunda dose pode estar relacionada com a idade das crianças, onde 1,0% estavam na idade correta para a administração da segunda dose, mas não haviam se imunizado, e 9,6% ainda não estavam na idade preconizada para receber a segunda dose da vacina.

Em 2010, as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, apresentaram os maiores níveis de cobertura vacinal, chegando a 96,2% na região Sudeste, contudo, nas regiões Norte e Nordeste essas taxas não foram tão elevadas, e a região Norte foi a que apresentou a menor taxa com 69,9% (Costa et al., 2016). Na região Nordeste a cobertura vacinal aumentou de

40,5% em 2006 para 82,74% em 2011 (Linhares & Justino, 2014). De acordo com os dados apresentados, observa-se que as taxas de vacinação deste estudo condizem com a cobertura vacinal tanto do Nordeste, quanto de outras regiões do Brasil. Além de corroborarem com os dados vacinais do estudo MAL-ED (The Etiology, Risk Factors, and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Child Health and Development), onde no Brasil, Peru e África do Sul, as taxas foram de 71,8%, 96,9% e 85,8%, respectivamente (Mohan et al., 2017).

Outro fator importante para a prevenção das GA causadas por agentes infecciosos, incluindo aquelas causadas por RVA, é o aleitamento materno (WHO, 2013; Ambikapathi et al., 2016). No presente estudo, as crianças mais acometidas foram as que tiveram amamentação parcial (amamentação entre 1-6 meses) com 35,5% dos casos, seguido por amamentação não exclusiva com 32,25%, amamentação exclusiva com 29% e aquelas que não foram amamentadas com 3,25%. Foi observado que houve uma significativa associação entre a ausência de RVA com crianças que tinham aleitamento materno exclusivo. Corroborando com os dados encontrados, Verkerke e colaboradores (2016) também observaram uma associação positiva quanto à amamentação exclusiva e a diminuição de risco de desenvolver rotavirose.

No projeto MAL-ED foi observado que o desmame precoce está relacionado principalmente com a escolaridade e a idade materna, além das condições financeiras, onde aquelas que fossem de maior idade, com maior escolaridade e com condições financeiras melhores eram as que amamentavam os seus filhos por mais tempo e que retornavam a amamentá-los (Ambikapathi et al., 2016). Corroborando com a avaliação das condições financeiras, no presente estudo, as crianças cuja família reportou renda familiar mensal ≤ 2 salários mínimos, foram as mais acometidas, sendo equivalentes a 77,4% das amostras positivas para RVA. Dessa forma, sugere-se que essas crianças foram desmamadas precocemente e conseqüentemente aumentando o risco de desenvolver a GA causada por RVA.

Os principais sintomas relatados nas GA causadas por RVA são diarreia aguda a severa e vômitos podendo gerar um quadro de desidratação, distúrbio eletrolítico e levar até a morte (WHO, 2013). Diante dos sintomas observados, no presente estudo, as crianças positivas para RVA apresentaram diarreia em 80,6% ($P=0,042$), seguido por febre 35,4% e vômito 29%. Outros sintomas foram relatados, como tosse ou sintomas respiratórios (22,6%),

inquietação (16,1%), fraqueza (12,9%), muco nas fezes (9,7%) e dor abdominal (6,5%), mas apenas a diarreia foi associada significativamente aos casos de RVA.

Corroborando com a sintomatologia descrita e com os resultados apresentados do presente estudo, o projeto MAL-ED, verificou que 54% (220/408) dos episódios de diarreia causados por RVA foram associados com vômito, 5,4% com febre e 1,9% com sangue nas fezes das crianças de todos os países (Mohan et al., 2017). Os sintomas relatados no presente estudo, também estão em concordância com outros trabalhos, como na Arábia Saudita onde 88,5% das crianças com RVA apresentaram vômito (Alayed et al., 2016); 63,5% das crianças com RVA apresentaram diarreia em Ouagadougou, Burkina Faso (Ouédraogo et al., 2016); em Rio Branco, Acre, onde 93,6% das crianças apresentavam diarreia, 80,9% febre e 59,6% vômito (Neves et al., 2016).

Afim de investigar os dados nutricionais das crianças do estudo, alterações das medidas antropométricas dos z escores (<-2) foram observados, indicando a presença de crianças desnutridas, 13,1% em relação a altura por idade (HAZ), 4,8% peso por altura (WHZ), 4,5% peso por idade (WAZ) e 4,1% índice de massa corpórea por idade. Além disso não foi observado a presença de RVA relacionada com as alterações nutricionais das crianças, como visto neste estudo, a partir do total de crianças com RVA apenas 19,3% apresentavam desnutrição, enquanto 80,7% tinham estado nutricional normal. Tal fato corrobora com um estudo coorte realizado em Dakar, Bangladesh, onde crianças desnutridas foram acompanhadas desde o nascimento e foi observada associação significativa entre melhor estado nutricional (z escores) e infecções por RVA (Verkerke et al., 2016). Este fator pode ser alicerçado em resposta aos esforços da ampla vacinação.

Através da análise dos genes que codificam para VP7 e VP4 (VP8*), os genótipos G1, G2 e G3, P[4], P[8] e P[9], foram detectados nas amostras do presente estudo, sendo G1P[8] (57%) a combinação mais prevalente. No Brasil em períodos pré-vacinais, a genotipagem de cepas de RVA circulantes demonstram que as combinações mais frequentemente encontradas foram: G1P[8] (43%), G9P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G5P[8] (Leite et al., 2008). Em contrapartida, na época pós-vacinal os genótipos G1P[6], G3P[6], G3P[8] G5P[8], G8P[8], G8P[4], G12P[8] e G12P[9], têm sido detectados com mais frequência nos últimos anos (Carvalho-Costa et al., 2011; Gómez et al., 2013, 2014; Sá et al., 2015; Luchs et al., 2016; da Silva et al., 2017).

Entretanto, mesmo após a introdução em massa da vacina RV1, em 2006, no Brasil, o genótipo G1P[8], continuou sendo detectado, evidenciando a importância da análise das amostras com este genótipo em diferentes regiões do Brasil (Rose et al., 2013). Em um estudo realizado por da Silva e colaboradores (2015), foi analisado a detecção de G1P[8] durante um período de 27 anos, em épocas pré e pós-vacinais, e foi observado que houve picos em diferentes anos (1994-1995; 1997-1998; 2000-2004 e 2008-2009) na detecção deste genótipo.

No presente estudo, os genótipos G1 e P[8] foram agrupados com a cepa da RV1, e foi visto que P[8] pertence à linhagem P[8]-1, além de apresentar similaridade nucleotídica de 98 a 100% com RV1. Esta similaridade pode ser evidenciada como caso de *shedding* vacinal. Corroborando com os achados, do presente estudo, *sheddings* vacinais também foram relatados por da Silva e colaboradores (2015) e Rose e colaboradores (2013). Ademais, 35-80% das crianças saudáveis, vacinadas com RV1 excretam o vírus vacinal dentro do período de 15 dias após a primeira dose e 11-29% após a segunda dose (Anderson et al., 2008). Dessa forma, o vírus da vacina quando excretados no meio ambiente pode oferecer proteção direta a crianças não vacinadas, assim a vacinação por rebanho pode aumentar e ser benéfico em populações com baixa cobertura vacinal (Rivera et al., 2011).

Além da combinação de G1P[8], também foram detectadas combinações como G1P[4], G2P[8] e G3P[9]. Essas combinações são atípicas e no Brasil poucos estudos relatam a circulação dessas cepas (Carvalho-Costa et al., 2011; Guerra et al., 2015; Bezerra et al., 2017). Devido à similaridade dos genótipos G1 e P[8] com RV1, no presente estudo, acredita-se que as combinações G1P[4] e G2P[8] possam ser derivadas de “*reassortments*” entre cepa da comunidade e vacinal, ou coinfeção entre os genótipos mais comuns G1P[8] e G2P[4]. Evidência do evento de “*reassortment*” entre as cepas G1P[8] e G2P[4], que co-circulavam na mesma cidade e mesma estação, foi relatada por Agbemabiese e colaboradores (2017) quando detectaram G1P[4] em duas crianças hospitalizadas. G3P[9] também está relacionada com eventos de *reassortments*, entre cepa humana e animal, como relata por Bezerra e colaboradores (2017). Mas para confirmação de ambos os eventos, para as amostras do presente estudo, se fazem necessárias análises do genoma completo de RVA.

8 CONCLUSÃO

Foi identificada uma ampla diversidade genética de cepas circulantes de RVA na população infantil do Semiárido Brasileiro. E através da análise filogenética, as amostras pertencentes ao genótipo G1 e P[8] apresentaram similaridade nucleotídica com a cepa da vacina RV1, evidenciando casos de “*shedding*” vacinal, além da possibilidade de vacinação em rebanho, quando o vírus é excretado no meio ambiente.

Também foram detectadas cepas incomuns como G1P[4], G2P[8] e G3P[9], que evidenciam eventos de “*reassortments*” e/ou infecções mistas.

Em relação à caracterização da população, o sexo masculino apresentou significância estatística associada à presença de RVA, já as idades de 0-12 meses e 12,1-24 meses, e crianças que se alimentavam exclusivamente de amamentação foram associadas a ausência de RVA.

O único sintoma que apresentou significância estatística foi diarreia. Os sintomas mais relatados, além de diarreia, foram febre, seguido de vômito. E de acordo com os dados antropométricos não houve associação entre estado nutricional e presença ou ausência de RVA na população do estudo, entretanto 80,7% das crianças positivas para RVA estavam em bom estado nutricional.

Os dados vacinais relataram que 89,3% da população estudada haviam sido imunizadas, e foi associado significativamente com a ausência de RVA relacionada à segunda dose da vacina, conferindo assim um alto percentual de cobertura vacinal e imunização.

Além de uma ampla arrecadação de dados clínicos e caracterização da população, o presente estudo contribui para a vigilância epidemiológica no Brasil, e reforça a importância da vacina contra RVA para continuar a diminuição das taxas de morbidade e mortalidade.

E ressalta-se que este trabalho é pioneiro no Brasil na detecção de RVA em crianças oriundas da região do Semiárido Brasileiro.

REFERÊNCIAS

AL-AYED, Mohammed Saeed Zayed et al. Epidemiology of Group A rotavirus infection after the introduction of monovalent vaccine in the National Immunization Program of Saudi Arabia†. **Journal of Medical Virology**, DOI: 10.1002/jmv.24664, 2016.

AGBEMABIESE, Chantal Ama et al. Reassortant DS-1-like G1P[4] *Rotavirus A* strains generated from co-circulating strains in Vietnam, 2012/2013. DOI: 10.1111/1348-0421.12501, 2017.

AMBIKAPATHI, Ramya et al. How multiple episodes of exclusive breastfeeding impact estimates of exclusive breastfeeding duration: report from the eight-site MAL-ED birth cohort study. **Maternal and Child Nutrition**, v. 12, p. 740-756, 2016.

ANDERSON, Evan J.; WEBER, Stephen G. Rotavirus infection in adults. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 91-99, 2004.

ANDERSON, Evan J. Rotavirus vaccines: viral shedding and risk of transmission. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 642-649, 2008

ANDERSON, Evan J. Prevention and treatment of viral diarrhea in pediatrics. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 2, p. 205-217, 2010.

ANGEL, Juana; FRANCO, Manuel A.; GREENBERG, Harry B. Rotavirus immune responses and correlates of protection. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 4, p. 419-425, 2012.

AOKI, Scott T. et al. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. **Science**, v. 324, n. 5933, p. 1444-1447, 2009.

ARIAS, Carlos F. et al. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. **Journal of Virology**, v. 70, n. 9, p. 5832-5839, 1996.

ARNOLDI, F. et al. Interaction of rotavirus polymerase VP1 with nonstructural protein NSP5 is stronger than that with NSP2. **Journal of Virology**, v. 81, n. 5, p. 2128-2137, 2007.

BALL, Judith M. et al. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. **Science**, v. 272, n. 5258, p. 101, 1996.

BÁNYAI, Krisztián et al. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. **Vaccine**, v. 30, p. A122-A130, 2012.

BARRO, Mario; PATTON, John T. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 11, p. 4114-4119, 2005.

BEZERRA, Delana AM et al. Analysis of a genotype G3P [9] rotavirus a strain that shows evidence of multiple reassortment events between animal and human rotaviruses. **Journal of medical virology**, v. 89, n. 6, p. 974-981, 2017.

BISHOP, RuthF et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **The Lancet**, v. 302, n. 7841, p. 1281-1283, 1973.

BLACK, Robert E. et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 375, n. 9730, p. 1969-1987, 2010.

BONICA, Melisa Berenice et al. Complete genome analysis of a rabbit rotavirus causing gastroenteritis in a human infant. **Viruses**, v. 7, n. 2, p. 844-856, 2015.

BOOM, R. C. J. A. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Informe Técnico – Doença Diarréica por Rotavírus: Vigilância Epidemiológica e Prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus Humano – VORH. Versão Preliminar, 2005. [Documento na Internet]. Disponível em: http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/informe_rotavirus2_1254747927.pdf

CARVALHO-COSTA, Filipe Anibal et al. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005–2009. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 30, n. 1, p. S35-S41, 2011.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Rotavírus. 2011. Disponível em: <https://www.cdc.gov/rotavirus/about/treatment.html>.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Rotavírus. 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/rotavirus/about/treatment.html>.

CONNER, M.E. & RAMIG, R.F. Viral Enteric Diseases. In: Viral Pathogenesis, ed. by Neal Nathanson et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997. P. 713-743.

COSTA, Iolanda et al. Sustained decrease in gastroenteritis-related deaths and hospitalizations in children less than 5 years of age after the introduction of rotavirus vaccination. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 35, n. 6, p.180-190, 2016.

DA SILVA, Marcelle Figueira Marques et al. G1P [8] species A rotavirus over 27years—Pre- and post-vaccination eras—in Brazil: Full genomic constellation analysis and no evidence for selection pressure by Rotarix® vaccine. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 30, p. 206-218, 2015.

DA SILVA, Marcelle Figueira Marques et al. VP7 and VP8* genetic characterization of group A rotavirus genotype G12P [8]: Emergence and spreading in the Eastern Brazilian coast in 2014. **Journal of Medical Virology**, v. 89, n. 1, p. 64-70, 2017.

DAVIDSON, G. P. et al. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. **The Lancet**, v. 305, n. 7901, p. 242-246, 1975.

DESSELBERGER, U. Genome rearrangements of rotaviruses. **Adv Virus Ver**, v. 46, p. 69-95. 1996.

DESSELBERGER, Ulrich. Rotaviruses. **Virus research**, v. 190, p. 75-96, 2014.

DO CARMO, Greice Madeleine Ikeda et al. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. **PLoS Med**, v. 8, n. 4, p. e1001024, 2011.

DONATO, Celeste M. et al. Genetic characterization of a novel G3P [14] rotavirus strain causing gastroenteritis in 12year old Australian child. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 25, p. 97-109, 2014.

DÓRÓ, Renáta et al. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure?. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 446-461, 2014.

DUNN, S. J. et al. Immunogenicity, antigenicity, and protection efficacy of baculovirus expressed VP4 trypsin cleavage products, VP5 (1)* and VP8* from rhesus rotavirus. **Archives of Virology**, v. 140, n. 11, p. 1969-1978, 1995.

EL KHOURY, Antoine Chaouki et al. Projecting the effectiveness of RotaTeq® against rotavirus-related hospitalisations in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 541-545, 2011.

ESTES MK, GREENBERGHB. Rotaviruses. **Fields Virology**. 6th edição. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia; p. 1347-1401. 2013.

FLEWETT, T. H. et al. Diagnostic electron microscopy of faeces II Acute gastroenteritis associated with reovirus-like particles. **Journal of Clinical Pathology**, v. 27, n. 8, p. 608-614, 1974.

FLEWETT, T. H.; WOODE, G. N. The rotaviruses. **Archives of Virology**, v. 57, n. 1, p. 1-23, 1978.

FUMIAN, Tulio M. et al. Performance of a one-step quantitative duplex RT-PCR for detection of rotavirus A and noroviruses GII during two periods of high viral circulation. **Journal of Virological Methods**, v. 228, p. 123-129, 2016.

GENTSCH, J. R. et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 1365-1373, 1992.

GLADSTONE, Beryl P. et al. Protective effect of natural rotavirus infection in an Indian birth cohort. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 4, p. 337-346, 2011.

GÓMARA, Miren Iturriza et al. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **Journal of virology**, v. 76, n. 13, p. 6596-6601, 2002.

GÓMARA, Miren Iturriza; DESSSELBERGER, Ulrich; GRAY, Jim. II, 12. Molecular epidemiology of rotaviruses: Genetic mechanisms associated with diversity. **Perspectives in Medical Virology**, v. 9, p. 317-344, 2003.

GOMÉZ, Mariela Martínez et al. Phylogenetic analysis of G1P[6] group A rotavirus strains detected in Northeast Brazilian children fully vaccinated with Rotarix™. **Infectious, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 395-402, 2013.

GOMÉZ, Mariela Martínez et al. Distinct evolutionary origins of G12P[8] and G12P[9] group A rotavirus strains circulating in Brazil. **Infectious, Genetics and Evolution**, p. 1-4, 2014.

GOUVEA, Vera et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 2, p. 276-282, 1990.

GRAFF, Joel W.; ETTAYEBI, Khalil; HARDY, Michele E. Rotavirus NSP1 inhibits NFκB activation by inducing proteasome-dependent degradation of β-TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 1, p. e1000280, 2009.

GUERRA, Sylvia FS et al. Rotavirus strain surveillance for three years following the introduction of rotavirus vaccine into Belém, Brazil. **Journal of medical virology**, v. 87, n. 8, p. 1303-1310, 2015.

GUERRANT, Richard L. et al. The impoverished gut—a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 4, p. 220-229, 2013.

GUERRERO, Carlos A. et al. Integrin αvβ3 mediates rotavirus cell entry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 26, p. 14644-14649, 2000.

GURGEL, Ricardo G et al. Incidence of Rotavirus and All-Cause Diarrhea in Northeast Brazil Following the Introduction of a National Vaccination Program. **Gastroenterology**, v. 137, p. 1970-1975, 2009

IANIRO, G. et al. Group A rotavirus genotypes in hospital-acquired gastroenteritis in Italy, 2012–14. **Journal of Hospital Infection**, 2017.

International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV. 2016 Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

ISA, P. et al. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. **Journal Virology**, v. 71, n. 9, p.6749-6756, 1997.

JOURDAN, Nathalie et al. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. **Journal of virology**, v. 71, n. 11, p. 8268-8278, 1997.

KHAMRIN, Pattara et al. Molecular characterization of a rare G3P [3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. **Journal of medical virology**, v. 78, n. 7, p. 986-994, 2006.

KHAMRIN, Pattara et al. Molecular characterization of VP4, VP6, VP7, NSP4, and NSP5/6 genes identifies an unusual G3P [10] human rotavirus strain. **Journal of medical virology**, v. 81, n. 1, p. 176-182, 2009.

KINDLER, Eveline et al. Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G. **Infection, genetics and evolution**, v. 14, p. 58-67, 2013.

KIRKWOOD, C. D.; BISHOP, R. F.; COULSON, B. S. Human rotavirus VP4 contains strain-specific, serotype-specific and cross-reactive neutralization sites. **Archives of virology**, v. 141, n. 3, p. 587-600, 1996.

KUMAR, Mukesh et al. Crystallographic and biochemical analysis of rotavirus NSP2 with nucleotides reveals a nucleoside diphosphate kinase-like activity. **Journal of virology**, v. 81, n. 22, p. 12272-12284, 2007.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, p. msw054, 2016. Disponível em: <http://mbe.oxfordjournals.org/>

LEITE, J. P. G. et al. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. **Archives of virology**, v. 141, n. 12, p. 2365-2374, 1996.

LEITE, José Paulo Gagliardi; CARVALHO-COSTA, Filipe Anibal; LINHARES, Alexandre C. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 745-753, 2008.

LINHARES, A. C. et al. Duovirus (rotavirus) em Belém do Pará, Brasil (nota prévia). **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 19, n. 4, p. 278-9, 1977.

LINHARES, Alexandre C. et al. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. **Reviews in medical virology**, v. 21, n. 2, p. 89-109, 2011.

LINHARES, Alexandre C; JUSTINO, Maria Cleonice A. Rotavirus vaccination in Brazil: effectiveness and health impact seven years post-introduction. **Expert Reviews**, v. 13, p. 43-57, 2014.

LIU, Jie et al. Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis. **Journal of Clinical Virology**, v. 50, n. 4, p. 308-313, 2011.

LIU, Jie et al. Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 1, p. 98-103, 2012.

LÓPEZ, Tomás et al. Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. **Journal of general virology**, v. 86, n. 6, p. 1609-1617, 2005.

LUCHS, Adriana et al. Detection of the emerging rotavirus G12P [8] genotype at high frequency in Brazil in 2014: Successive replacement of predominant strains after vaccine introduction. **Acta tropica**, v. 156, p. 87-94, 2016.

LUDERT, Juan E. et al. Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo. **Journal of virology**, v. 70, n. 1, p. 487-493, 1996.

MATSUNO, Shigeo et al. Isolation of a recombinant between simian and bovine rotaviruses. **Journal of General Virology**, v. 48, n. 1, p. 253-256, 1980.

MATTHIJNSSENS, Jelle et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Archives of virology**, v. 156, n. 8, p. 1397-1413, 2011.

MATTHIJNSSENS, Jelle et al. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Archives of virology**, v. 157, n. 6, p. 1177-1182, 2012.

MATTHIJNSSENS, Jelle; VAN RANST, Marc. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. **Current opinion in virology**, v. 2, n. 4, p. 426-433, 2012.

MCCLAIN, Brian et al. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. **Journal of molecular biology**, v. 397, n. 2, p. 587-599, 2010.

MCDONALD, Sarah M. et al. Shared and group-specific features of the rotavirus RNA polymerase reveal potential determinants of gene reassortment restriction. **Journal of virology**, v. 83, n. 12, p. 6135-6148, 2009.

MCDONALD, Sarah M.; PATTON, John T. Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. **Trends in microbiology**, v. 19, n. 3, p. 136-144, 2011.

MIHALOV-KOVÁCS, Eszter et al. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 4, p. 660, 2015.

MIJATOVIC-RUSTEMPASIC, Slavica et al. Full genome characterization of the first G3P [24] rotavirus strain detected in humans provides evidence of interspecies reassortment and mutational saturation in the VP7 gene. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 2, p. 389-402, 2016.

MOHAN, Venkata Raghava et al. Rotavirus infection and disease in a multi-site birth cohort: Results from the MAL-ED study. **The Journal of Infectious Diseases**, p. jix199, 2017.

MONTERO, Hilda; ARIAS, Carlos F.; LOPEZ, Susana. Rotavirus nonstructural protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. **Journal of virology**, v. 80, n. 18, p. 9031-9038, 2006.

- MOORE, Sean R. et al. Prolonged episodes of acute diarrhea reduce growth and increase risk of persistent diarrhea in children. **Gastroenterology**, v. 139, n. 4, p. 1156-1164, 2010.
- MUSALEM, Claudette; ESPEJO, Romilio T. Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11. **Journal of general virology**, v. 66, n. 12, p. 2715-2724, 1985.
- NAKAGOMI, Toyoko et al. Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. **Arch Virol**, v. 153, p. 591-593, 2008.
- NEVES, Mayara A. O. et al. High prevalence of G12P[8] rotavirus strains in Rio Branco, Acre, Western Amazon, in the post-rotavirus vaccine introduction period. **Journal of Medical Virology**, v. 88, p. 782-789, 2016.
- OUÉDRAOGO, Nafissatou et al. Prevalence and genetic diversity of enteric viruses in children with diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. **Plos One**, v. 11 p. 1-22, 2016.
- PADILLA-NORIEGA, Luis; PANIAGUA, Octavio; GUZMÁN-LEÓN, Simón. Rotavirus protein NSP3 shuts off host cell protein synthesis. **Virology**, v. 298, n. 1, p. 1-7, 2002.
- PATTON, John T. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. **Discovery medicine**, v. 13, n. 68, p. 85, 2012.
- PLATTS-MILLS, James A et al. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). **The Lancet**, p. 1-12, 2015
- RIVERA, Luis et al. Horizontal transmission of a human rotavirus vaccine strain—A randomized, placebo-controlled study in twins. **Vaccine**, v. 29, p. 9508-9513, 2011.
- ROSE, Tatiana Lundgren et al. Evidence of vaccine-related reassortment of rotavirus, Brazil, 2008–2010. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 11, p. 1843, 2013.
- RUIZ-PALACIOS, Guillermo M. et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 1, p. 11-22, 2006.

SÁ, Ana Caroline C. et al. Group a rotavirus and norovirus genotypes circulating in the northeastern Brazil in the post-monovalent vaccination era. **Journal of medical virology**, v. 87, n. 9, p. 1480-1490, 2015.

SANDERSON, Colin et al. Global review of rotavirus morbidity and mortality data by age and region. **Report to WHO/IVB**, 2011. Disponível em: http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2012/april/Sanderson_et_al_SAGE_April_rotavirus.pdf

SANTOS, Norma; HOSHINO, Yasutaka. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. **Reviews in medical virology**, v. 15, n. 1, p. 29-56, 2005.

SVENSSON, L et al. Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. **Journal of General Virology**. v. 68. p. 643–651. 1987.

TANIGUCHI, Koki; URASAWA, Shozo. Diversity in rotavirus genomes. In: **Seminars in VIROLOGY**. Academic Press, 1995. p. 123-131.

TANIUCHI, Mami et al. Etiology of diarrhea in Bangladeshi infants in the first year of life analyzed using molecular methods. **The Journal of infectious diseases**, v. 208, n. 11, p. 1794-1802, 2013.

TANIUCHI, Mami et al. High throughput multiplex PCR and probe-based detection with Luminex beads for seven intestinal parasites. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 84, n. 2, p. 332-337, 2011.

TARAPOREWALA, Zenobia F.; PATTON, John T. Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2. **Journal of virology**, v. 75, n. 10, p. 4519-4527, 2001.

TARAPOREWALA, Zenobia F.; PATTON, John T. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. **Virus research**, v. 101, n. 1, p. 57-66, 2004.

TARAPOREWALA, Zenobia; CHEN, Dayue; PATTON, John T. Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. **Journal of virology**, v. 73, n. 12, p. 9934-9943, 1999.

TATE, Jacqueline E. et al. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children < 5 years of age, 2000–2013. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. suppl_2, p. S96-S105, 2016.

TRASK, Shane D.; MCDONALD, Sarah M.; PATTON, John T. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 165-177, 2012.

TSUGAWA, Takeshi; RAINWATER-LOVETT, Kaitlin; TSUTSUMI, Hiroyuki. Human G3P [9] rotavirus strains possessing an identical genotype constellation to AU-1 isolated at high prevalence in Brazil, 1997–1999. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 3, p. 590-600, 2015.

VARANI, Gabriele; ALLAIN, Frédéric H.-T. How a rotavirus hijacks the human protein synthesis machinery. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 9, n. 3, p. 158, 2002.

VASQUEZ-DEL CARPIO, Rodrigo et al. Histidine triad-like motif of the rotavirus NSP2 octamer mediates both RTPase and NTPase activities. **Journal of molecular biology**, v. 362, n. 3, p. 539-554, 2006.

VENKATARAM BV, et al. Structural studies on gastroenteritis viruses. **Gastroenteritis viruses**, edited by D, Chadwick and J A Goode, Chichester: John Wiley & Sons Ltd., p. 26-46. 2001.

VERKERKE, Hans et al. Malnutrition Is Associated with Protection from Rotavirus Diarrhea: Evidence from a Longitudinal Birth Cohort Study in Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 10, p.2568-2574, 2016.

VIZZI, Esmeralda et al. Human rotavirus strains circulating in Venezuela after vaccine introduction: predominance of G2P [4] and reemergence of G1P [8]. **Virology journal**, v. 14, n. 1, p. 58, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on immunization, October 2009-conclusions and recommendations. **Weekly Epidemiological Record**, v. 84, n. 50, p. 517-532, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Rotavirus vaccines WHO position paper: January 2013-recommendations. **Vaccine**, v. 31, n. 52, p. 6170-6171, 2013.

XIA, Lele et al. The complete genome sequence of a G3P [10] Chinese bat rotavirus suggests multiple bat rotavirus inter-host species transmission events. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 28, p. 1, 2014.

YEN, Catherine et al. Rotavirus vaccines: update on global impact and future priorities. **Human vaccines**, v. 7, n. 12, p. 1282-1290, 2011.

ZENG, S.-Q. et al. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **Journal of virological methods**, v. 153, n. 2, p. 238-240, 2008.

ZHANG, Mingdong et al. A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. **Journal of virology**, v. 74, n. 24, p. 11663-11670, 2000.

ANEXO A – COMITÊ NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER N° 760/2006

Registro CONEP: 12729 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 238/05

Processo nº 25000.017262/2006-38

Projeto de Pesquisa: "Intervenção com micronutrientes e impacto a longo prazo no Brasil." Protocolo (Re-ICIDR) DMID 05-0071, versão 3.0 – Tradução revisada em 23/11/2005. Pesquisador Responsável: Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

Instituição: Universidade Federal do Ceará /CE

Patrocinador: National Institute of Allergy and Infectious Diseases - NIAID

Área Temática Especial: Genética Humana; Cooperação Estrangeira

Após se proceder à análise das respostas ao Parecer CONEP nº 352/2006, referente ao projeto de pesquisa supracitado, considerou-se em geral atendidas/esclarecidas a maioria das questões. No entanto cabem ainda as seguintes considerações:

1. A resposta referente à questão 5 deve ser melhor esclarecida no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, devendo estar explicitada a responsabilidade do pesquisador mediante qualquer dano. Não basta apenas a citação quanto ao direito a reclamar legalmente.
2. Com relação à questão 6, foi anexado o encaminhamento solicitando análise e parecer do Comitê de Ética da Universidade de Virgínia, EUA (país de origem). Aguarda-se, portanto, o documento de aprovação por Comitê de Ética em Pesquisa desse país.
3. Quanto à questão 7, o pesquisador concorda com as citações das resoluções do CNS referentes à interrupção do estudo. Entretanto, deve estar esclarecido no próprio parágrafo da pág. 45 do protocolo as referências às resoluções e/ou anexar declaração de que caso haja necessidade de interrupção do estudo, a mesma se dará conforme o disposto nos itens III.3."z" e VII.13."f" da Res. CNS196/96 e item III.2."e" da Res. CNS 251/97.
4. A questão 8 foi parcialmente atendida. Nos critérios de inclusão não foi feita a referência aos 2000 familiares que serão doadores do material genético.
5. Em atendimento à questão 14, relativa ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE, foram apresentados dois TCLE (um para a pesquisa com micronutrientes e outro para a pesquisa genética) em atendimento aos sub-ítem da referida questão, porém com datas de versão de 08/04/2005, anterior à versão apresentada inicialmente (23/11/2005) e anterior à data do Parecer CONEP 352/2006 (datado de 20/04/2006). Esclarecer. Entenda-se que as versões do TCLE devem constar data posterior ao parecer da CONEP.
6. No TCLE específico para a pesquisa para micronutrientes, deve ser excluída a frase que considera como benefício a assistência médica gratuita e o fornecimento gratuito dos suplementos em teste. Este fato poderia ser considerado como infringente à autonomia pois pode ser considerada uma

Cont. Parecer CONEP Nº 760/2006

possível indução ao sujeito da pesquisa, infringindo a sua autonomia, uma vez que não se caracteriza realmente como benefício para os sujeitos, já que o acesso a tratamento deve ser garantido a todos. Tal frase poderia ser colocada, por exemplo, num item denominado "custos".

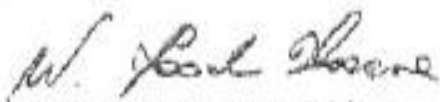
7. No TCLE específico para a pesquisa genética não cabe referências a administração do medicamento em estudo, mencionada em alguns itens. Rever.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96 manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, com a seguinte recomendação a ser acompanhada pelo CEP que informará a CONEP:

- Que sejam atendidas as questões acima, antes do início do estudo.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação

Brasília, 14 de julho de 2006.


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFC

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 338/09

Fortaleza, 20 de novembro de 2009

Protocolo COMEPE nº 238/05

Pesquisador responsável: Aldo Ângelo Moreira Lima

Deptº./Serviço: Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFC

Título do Projeto: "Intervenção com micronutrientes e impacto a longo prazo no Brasil - Subprojeto 2A"

Levamos ao conhecimento de V.Sª. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou a realização do subprojeto 2A na reunião do dia 19 de novembro de 2009 nas cidades de Crato, Picos, Cajazeiras, Sousa, Limoeiro e Pacajus cujas declarações de anuência foram apresentadas.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

*Intervenção com Micronutrientes e Impacto a Longo Prazo no Brasil
(Semi-Árido Brasileiro: Objetivos 2a e 2c)*

Nome do Participante _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos convidando sua criança para participar de uma pesquisa de genética para infecções gastrintestinais e impedimento de crescimento e desenvolvimento. Este estudo é uma parceria entre a Universidade Federal do Ceará e a Universidade da Virgínia, nos Estados Unidos. Amostras de fezes, dados antropométricos e dados sócio-culturais serão coletados e examinados. Faremos testes de DNA nas amostras coletadas para ver as características hereditárias que podem previamente produzir infecções gastrintestinais ou impedimento do crescimento e desenvolvimento.

O objetivo deste estudo é aprender sobre a tendência para infecções gastrintestinais e seus efeitos no desenvolvimento. O objetivo do teste genético é identificar os fatores que contribuem para o desenvolvimento de certas doenças.

Para participar deste estudo você deve concordar com os termos aqui expostos.

O que estamos tentando descobrir:

Sua criança foi selecionada porque mora numa cidade situada na região do semi-árido brasileiro e está na faixa etária entre 2 e 36 meses, além de não apresentar sintoma diarréico nos últimos 15 dias antes da coleta das amostras

Nosso grupo de pesquisa tem estudado o impacto das doenças diarréicas em crianças de comunidades carentes de Fortaleza. Os estudos realizados permitiram a associação entre as diarréias persistentes e algumas infecções entéricas específicas com a ruptura da barreira intestinal, provocando alterações na sua função absorptiva e predispondo crianças a uma maior carga diarréica. Observamos que a ocorrência de doenças diarréicas nos dois primeiros anos de vida e a presença de determinados patógenos entéricos, podem influenciar no crescimento linear da criança. Episódios de diarréia persistente nos dois primeiros anos de vida mostraram ter associação com um déficit de crescimento de 1,5 a 4cm aos 4 a 6 anos de idade nessas crianças. Além disso, a idade de início da criança na escola e a idade por ano escolar são significativamente atrasadas pelas doenças diarréicas ocorridas no início da infância.

Na busca por alternativas para a diminuição do impacto causado pelas doenças diarréicas causadas por vírus, bactérias ou parasitas, observamos a grande eficiência da solução de re-hidratação oral baseada em glutamina quando comparada à tradicional solução à base de glicose. Além disso, temos testado a influência da suplementação de micronutrientes, como zinco, vitamina A e arginina, na dieta de crianças susceptíveis às doenças diarréicas, observando a redução no número de crianças doentes.

Estes estudos têm sido realizados em duas comunidades carentes de Fortaleza: Parque Universitário e Gonçalves Dias, ambas situadas em Fortaleza e próximas à Faculdade de Medicina. Acompanhando os quadros diarréicos dessas duas comunidades ao longo dos últimos 20 anos, observamos que mesmo nas crianças que não apresentam diarréia como sintoma, ainda existe uma alta prevalência de inflamação intestinal e de enteropatógenos que podem oportunamente causar as doenças diarréicas quando as defesas imunológicas são reduzidas. Isso vem acontecendo principalmente em virtude de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e da carência de uma dieta nutricional balanceada.

Para que possamos realmente avaliar o impacto lesivo da presença destes agentes infecciosos, principalmente quando não há diarréia, se faz necessária a avaliação destes agentes em crianças que não residem nessas comunidades. Os resultados deste estudo para os participantes serão mensurados em termos de conhecimento do risco para as doenças diarréicas. A sociedade em geral se beneficia de qualquer redução nestas doenças da pobreza.

O que acontecerá:

Existem duas partes para este estudo:

1. Um profissional de saúde (enfermeira e/ou agente de saúde) coletará uma amostra de fezes e um pouco de saliva, através de um bochecho, de sua criança;
2. Um questionário será aplicado para coletar informações sócio-ambientais;
3. Medidas antropométricas serão também verificadas e registradas em um formulário;
4. As amostras serão enviadas para o Laboratório de Doenças Infecciosas para realizar testes específicos para este estudo. As amostras de fezes serão avaliadas através de métodos e técnicas de biologia molecular para a detecção de bactérias que prejudicam o intestino;
5. Suas amostras ficarão armazenadas por 5 anos após o final do estudo para futuras validações dos testes.

Benefícios:

A detecção de helmintos e protozoários, através do exame parasitológico de fezes, ou de crescimento de bactéria reconhecidamente prejudicial ao intestino será informada aos responsáveis e uma indicação de tratamento será indicada pelo médico pediatra responsável pelo estudo.

Versão: 06.04.2009

(Versão: 001)


Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

Página 1 de 2

Riscos:

Não existem riscos físicos, sociais ou psicológicos neste estudo.

Confidencialidade:

A confidencialidade e a privacidade dos dados de sua criança serão resguardadas, segundo normas éticas brasileiras.

Responsabilidade em Caso de Danos:

Se seu filho apresentar qualquer dano como resultado direto do estudo, você deverá entrar em contato com o Dr. Aldo Lima no fone: 3366 8437 para receber a terapia necessária. Qualquer dano resultante de sua participação será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e assistência integral que você passa a ter direito ao assinar este formulário de consentimento e entrar na pesquisa, pois todo dano mediante o estudo é de inteira responsabilidade do pesquisador.

Para quem ligar:

Se você tem: (1) alguma questão sobre o estudo, por favor ligue para Dr Aldo A.M. Lima, Unidade de Pesquisa Clínica, UFC (Tel.: 3366 8445); (2) alguma questão sobre seus direitos como participante de um estudo, por favor ligue para Comitê de Ética em Pesquisa da UFC (COMEPE), Tel.: 3366.8346, ou peça a alguém do estudo para ajudar você a contatar com as pessoas citadas acima.

Direito de desistir:

A participação de sua criança neste estudo é completamente voluntária. Você é livre para retirá-la do estudo a qualquer momento sem prejuízos. Apenas avise a um dos membros da equipe.

Nome do Sujeito
(Se < 18 anos)

Pai ou Guardião Legal
(NOME LETRA FORMA)

Pai ou Guardião Legal
(ASSINATURA)

dd/ mm/ ano

Assinatura da Testemunha


dd/ mm/ ano

Assinatura do Membro da Pesquisa

dd/ mm/ ano


Dra. Miran Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO D – FICHA EPIDEMIOLÓGICA

FORMULÁRIO			
ETIOLOGIA DE DIARREIA DO SEMI-ÁRIDO			
Caso não exista resposta para alguma pergunta, escreva ND como resposta.			
#	Questão	Código	Resposta
01	Data da Aplicação do Questionário	(dd/mmm/aa)	<input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/>
Informações sobre a criança:			
02	Data de nascimento	(dd/mmm/aa)	<input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/>
03	Sexo	1-masculino; 2-feminino	<input type="checkbox"/>
04	Alimentação da criança	1-amamentação exclusiva; 2-amamentação não-exclusiva; 3-não amamenta mais; 4-nunca foi amamentada; 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
05	Se a resposta anterior for 3 (não amamenta mais), por quanto tempo a criança foi amamentada?	meses	<input type="text"/> <input type="text"/>
Antropometria:			
06	Peso	kg	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
07	Altura	cm	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
08	Circunferência da cabeça	cm	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Informações sobre o responsável:			
09	Grau de parentesco com a criança	1-mãe; 2-pai; 3-avó (o); 4-vizinha(o); 5-tia (o), 6-outro	<input type="checkbox"/>
10	Caso a resposta à questão anterior seja 6 (outro parentesco), favor especificar.		<hr/>

11	Idade da mãe da criança	anos	<input type="text"/> <input type="text"/>
12	Grau de escolaridade da mãe	1-não estudou; 2-primário incompleto; 3-primário completo; 4-secundário incompleto; 5-secundário completo; 6-superior incompleto; 7-superior completo; 9-não sabe	<input type="text"/>
13	Idade da primeira gestação	anos	<input type="text"/> <input type="text"/>
Condições sócio-econômicas e higiênico-sanitárias da família da criança:			
14	Qual o tipo de casa em que a criança vive?	1-talpa; 2-alvenaria; 3-mista; 4-outra; 9-não sabe	<input type="text"/>
15	Caso a resposta à questão anterior seja 4 (outro tipo de habitação), favor especificar.		_____
16	Número total de cômodos/compartimentos da casa		<input type="text"/> <input type="text"/>
17	Número total de habitantes da casa (crianças e adultos)		<input type="text"/> <input type="text"/>
18	Número de habitantes da casa menores de 5 anos		<input type="text"/> <input type="text"/>
19	Renda familiar (em salários mínimos)	1- < ½; 2- ½ a 1; 3-1 a 2; 4-2 a 3; 5-3 a 5; 6- >5; 9-não sabe	<input type="text"/>
20	A água de beber da casa é proveniente de	1- água encanada; 2-poço profundo; 3-cacimba; 4-carroça; 5-rio/açude; 6-cisterna; 7-carro pipa; 8-água mineral; 9-não sabe; 10-outra fonte	<input type="text"/>
21	Caso a resposta à questão anterior seja 10 (outra fonte de água), favor especificar.		_____

22	O que faz antes de utilizar a água para beber?	1- ferve; 2-usa filtro; 3-usa solução de cloro; 4-nenhuma ação; 5-outra; 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
23	Caso a resposta à questão anterior seja 5 (outra ação), favor especificar.		_____
24	Tipo de esgotamento sanitário da casa	1-fossa; 2-rede/esgoto público (sanear); 3-sem sistema de esgoto	<input type="checkbox"/>
25	Há sanitário dentro da casa?	1-sim; 2-não	<input type="checkbox"/>
26	Existe água corrente e sabão para lavar as mãos perto do sanitário?	1-sim; 2-não	<input type="checkbox"/>
27	Com qual frequência água corrente e sabão são utilizados para lavar as mãos?	1-sempre; 2-frequentemente; 3-poucas vezes; 4-raramente; 5-nunca; 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
28	Crianças menores de 5 anos defecam no chão da casa/quintal?	1-sempre; 2-frequentemente; 3-poucas vezes; 4-não ou raramente, 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
29	Animais costumam ficar dentro de casa ou ao redor (no quintal)?	1-sim; 2-não; 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
30	Caso a resposta à questão anterior seja 1 (sim), favor especificar qual(is) animal(is).		_____
Condições clínicas da criança			
31	Sua criança apresentou 3 ou mais fezes líquidas nas últimas 24 horas? (CASO A RESPOSTA SEJA NÃO, VÁ PARA A QUESTÃO 38)	1-sim; 2-não	<input type="checkbox"/>

32	Caso a resposta à questão anterior seja 1 (sim), favor especificar a quantos dias a criança vem apresentando diarreia.		<input type="text"/> <input type="text"/>
33	Quantas evacuações em 24 horas? (Maior número recordado)		<input type="text"/> <input type="text"/>
34	Sinais/sintomas observados pelo guardião ou reportados pela criança:		
34.1	Dor abdominal	1- sim; 2-não; 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
34.2	Vômito		<input type="checkbox"/>
34.3	Muco nas fezes		<input type="checkbox"/>
34.4	Sangue nas fezes		<input type="checkbox"/>
34.5	Fraqueza		<input type="checkbox"/>
34.6	Inquietação		<input type="checkbox"/>
34.7	Tosse ou sintomas respiratórios		<input type="checkbox"/>
34.8	Desidratação (Entrevistador, favor se reportar à tabela 1, em anexo, para classificação de desidratação ao final do questionário)	1-moderada; 2-grave; 7-grau não identificado; 8-não está desidratada; 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
34.9	Febre	1- sim; 2-não; 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
34.9.1	Caso tenha realizado medida com termômetro, Informe a maior medida recordada.	Medida em °C (ou ND)	<input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/>
34.10	Outros sintomas ou doenças concomitantes	1- sim; 2-não; 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
35	Caso a resposta à questão 34.10 seja 1 (sim), favor especificar.		<hr/> <hr/> <hr/>

36	A criança recebeu algum tratamento durante a diarreia?	1= sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>		
37	Caso a resposta à questão 36 seja 1 (sim), favor especificar.		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		
38	Sua criança apresentou diarreia nos últimos 14 dias?	1= sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>		
Situação vacinal da criança					
39. A criança recebeu as seguintes vacinas? 1= sim; 2=não; 9=não sabe					
39.1	BCG <i>(ao nascer, contra formas graves de tuberculose)</i>		<input type="checkbox"/> ao nascer		
39.2	SRC <i>(sarampo, rubéola, caxumba, 12 meses)</i>		<input type="checkbox"/> 12 meses		
39.3	Hepatite B <i>(ao nascer, reforços em 1 e 6 meses)</i>	<input type="checkbox"/> 1 mês	<input type="checkbox"/> 6 meses		
39.4	VORH <i>(vacina oral contra rotavírus humano; 2 e 4 meses)</i>	<input type="checkbox"/> 2 meses	<input type="checkbox"/> 4 meses		
39.5	Hib <i>(meningite e outras infecções causadas pelo <u>Haemophilus influenzae</u> tipo B; 2, 4 e 6 meses)</i>	<input type="checkbox"/> 2 meses	<input type="checkbox"/> 4 meses	<input type="checkbox"/> 6 meses	
39.6	DPT: "Tríplice" <i>(difteria, tétano, coqueluche; 2, 4, 6 e 15 meses)</i>	<input type="checkbox"/> 2 meses	<input type="checkbox"/> 4 meses	<input type="checkbox"/> 6 meses	<input type="checkbox"/> 15 meses
39.7	VOP: "Gotinha" <i>(vacina oral contra pólio; 2, 4, 6 e 15 meses)</i>	<input type="checkbox"/> 2 meses	<input type="checkbox"/> 4 meses	<input type="checkbox"/> 6 meses	<input type="checkbox"/> 15 meses

Questões para o entrevistador			
40	Foi coletada amostra de fezes?	1- sim; 2-não	<input type="checkbox"/>
41	Foi coletada amostra de saliva?	1- sim; 2-não	<input type="checkbox"/>
42	A criança foi classificada como caso ou controle?	1- caso; 2-controle	<input type="checkbox"/>

Entrevistador: _____

Assinatura: _____



ANEXO

Tabela 1: Classificação dos graus de desidratação

PERGUNTAS	RESPOSTAS*					
	A		B		C	
Diarreias	Até 4 dejeções líquidas/dia	<input type="checkbox"/>	De 4 a 10 dejeções líquidas/dia	<input type="checkbox"/>	+ de 10 dejeções líquidas/dia	<input type="checkbox"/>
Vômitos	Ausente	<input type="checkbox"/>	Pouca quantidade	<input type="checkbox"/>	Muito frequente	<input type="checkbox"/>
Sede	Normal	<input type="checkbox"/>	Aumentada	<input type="checkbox"/>	Não pode beber	<input type="checkbox"/>
Urina	Normal	<input type="checkbox"/>	Pouca, escura	<input type="checkbox"/>	Nenhuma em 6h	<input type="checkbox"/>
Olhos	Normais	<input type="checkbox"/>	Fundos	<input type="checkbox"/>	Muito fundos	<input type="checkbox"/>
Boca e Língua	Molhadas	<input type="checkbox"/>	Secas	<input type="checkbox"/>	Ressecadas	<input type="checkbox"/>
Pele	Pressionada, volta ao normal	<input type="checkbox"/>	Pressionada, volta lentamente	<input type="checkbox"/>	Pressionada, volta muito lentamente	<input type="checkbox"/>
Desidratação	Caso apresente estes sintomas:		Caso apresente dois ou mais destes sintomas		Caso apresente dois ou mais destes sintomas	
	NÃO		SIM, MODERADA		SIM, GRAVE	

*As respostas A, B e C correspondem a intensidades crescentes dos sinais e sintomas de desidratação.