



Ministério de Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ANA CAROLINE COSTA SÁ

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE ROTAVÍRUS DA ESPÉCIE A
E NOROVÍRUS EM AMOSTRAS FECAIS HUMANAS DE FORTALEZA, CEARÁ.**

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Orientador:

Dr. José Paulo Gagliardi Leite

RIO DE JANEIRO

2012



Ministério de Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: *Ana Caroline Costa Sá*

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE ROTAVÍRUS DA ESPÉCIE A E NOROVÍRUS EM AMOSTRAS FECAIS HUMANAS DE FORTALEZA, CEARÁ.

ORIENTADOR:

Dr. José Paulo Gagliardi Leite

EXAMINADORES:

Dra. Caroline Cordeiro Soares – IOC – Fiocruz – Presidente

Dra. Vanessa Salete de Paula – IOC – Fiocruz

Dra. Debora R. Lopes dos Santos – UFRRJ

SUPLENTES:

Dra. Luciane Almeida Amado – IOC – Fiocruz

Dra. Cláudia Lamarca Vitral – UFF

Rio de Janeiro, 22 de março de 2012

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ sob orientação do Dr. José Paulo Gagliardi Leite.

*Toda a nossa ciência,
comparada com a
realidade, é primitiva e
infantil - e, no entanto, é a
coisa mais preciosa que
temos.*

(Albert Einstein)

Dedico este trabalho aos meus pais, **Sônia e Delmar**, pela minha formação e pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A distância da família e dos amigos foi um grande obstáculo durante a realização deste trabalho. O caminho até chegar aqui foi árduo, tenho muito a agradecer:

A Deus, “inteligência suprema e causa primária de todas as coisas”, meu sustentáculo nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, pelo apoio em ligações telefônicas, *Skype*, *Gtalk*, e-mails e mais importante, pelo pensamento voltado para o bem e otimismo. Levarei o amor que nos une para sempre em meu coração. Vocês são grandes exemplos de vida em abundância! Se eu pude chegar até aqui, é porque sempre “enxerguei a vida nos ombros de gigantes”, que são vocês!

Aos meus irmãos, Marcus e Ana Paula, que com alegria e companheirismo incentivaram a transposição dos obstáculos.

Aos demais familiares, pelo carinho, pelas orações e intensa torcida pelo meu sucesso.

Ao Roque, pelo amor, carinho, paciência, cuidado, companheirismo e “colo”. Por enxugar as minhas lágrimas e me fazer sorrir nos momentos de estresse.

Aos amigos espirituais, que sempre me auxiliaram nesta jornada com intuições, proteção, amparo, harmonia e muito amor!

À Eneida, Iolanda, Sabina e Fernanda pelas conversas, desabafos, apoio e companheirismo, compartilhando o mesmo lar. Especialmente à Eneida, eu agradeço por me acolher, com tanto carinho, na sua casa durante todo o período de desenvolvimento e elaboração deste trabalho.

A todos do LVCA! É um orgulho fazer parte dessa família!

Ao meu orientador, Dr. José Paulo Gagliardi Leite, pela oportunidade de fazer o mestrado, de aprender com os erros e acertos, por me “adotar” como aluna e confiar no meu trabalho e potencial. Especialmente, pelo incentivo das conversas, por se preocupar com o meu bem-estar, mesmo “tirando o meu couro” no trabalho.

À Mariela, por me guiar no laboratório quando eu me sentia perdida, por me ensinar tudo assim que eu cheguei, pela primeira revisão dos textos deste trabalho,

pelas conversas sobre a vida durante as viagens entre a FIOCRUZ e a minha casa, e pela nossa amizade.

À Ana Carolina Ganime, minha “xará”, pelos abraços nos momentos difíceis, pela impressão da dissertação quando eu não podia fazê-la, pela amizade e apoio nos meus momentos de insegurança.

A todos os amigos da B205 pela amizade, paciência, companheirismo e agradável companhia de todos os dias.

À Dra. Adriana Correia, especialmente, por me ensinar a técnica de PCR em tempo real.

À Carmem, Adriana, Júlia, Ana Pinto, Hugo, Marcelle, Alexandre Fialho, Pâmella, Thiago, Tatiana Prado, Tatiana Rose, Juliana Andrade, Juliana Bragazzi, Ana Carolina Ganime, Mariela, Thaís, Thaíse, Regis, Lendel, Carol Tinga, Matías, Mônica, Maria da Penha, Rosane, Silvana, Marilda, Elioneide e Chica pela convivência durante a realização dos experimentos deste trabalho, pela ajuda nos momentos de dúvida, por tudo o que eu aprendi com vocês.

Ao Dr. Eduardo de Mello Volotão, pela amizade, conselhos, risadas, discussão de resultados e incentivo para a realização deste trabalho.

À Chica, guia espiritual do laboratório e mãe da família LVCA, pelo carinho, abraços, apoio e compreensão de todos os momentos. Você vale mais que ouro!

Aos meus colegas de turma do mestrado em Biologia Parasitária. A alegria, companheirismo e amizade de vocês tornaram as aulas momentos muito mais prazerosos. Guardo vocês no coração! Espero que a vida profissional me proporcione, sempre que possível, o encontro com pessoas como vocês!

Aos Doutores Aldo Lima e Reynaldo Oriá, por cederem as amostras para realização deste trabalho. Agradeço muitíssimo pela confiança e pelas sugestões.

À equipe do Instituto de Biomedicina do Semi-árido brasileiro, especialmente à Josiane, por me acolher e ser sempre tão prestativa em tudo o que se relacionou a realização deste trabalho.

À Dra. Caroline Soares, pelo brilhante trabalho de revisão desta dissertação.

A todos os membros da banca examinadora, pela atenção dispensada a este trabalho.

À Plataforma de sequenciamento (PDTIS) da FIOCRUZ.

À Equipe do Laboratório do Dr. Marcos de BioManguinhos, especialmente ao Rafael Lawson pela ajuda durante o sequenciamento.

Aos professores das disciplinas do curso de mestrado em Biologia Parasitária.

À coordenação do curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos de Brasília, que mesmo de longe, demonstraram carinho, compreensão, amizade e bons momentos que passamos juntas. A nossa amizade envelhece como um bom vinho, que fica cada vez melhor!

A todos aqueles que de alguma forma auxiliaram neste trabalho, mas que não foram aqui citados diretamente.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Gastroenterite aguda de etiologia viral.....	1
1.2 Os rotavírus da espécie A.....	3
1.2.1 Histórico	3
1.2.2 A partícula viral.....	3
1.2.3 Proteínas estruturais dos rotavírus	5
1.2.4.1 VP1.....	5
1.2.4.2 VP2.....	5
1.2.4.3 VP3.....	5
1.2.4.4 VP4.....	6
1.2.4.5 VP6.....	7
1.2.4.6 VP7.....	8
1.2.4 Proteínas não estruturais dos rotavírus	9
1.2.4.1 NSP1	9
1.2.4.2 NSP2	10
1.2.4.3 NSP3	10
1.2.4.4 NSP4	10
1.2.4.5 NSP5	12
1.2.4.6 NSP6	12
1.2.5 Biossíntese viral	13
1.2.6 Classificação dos rotavírus da espécie A.....	15
1.2.7 Epidemiologia dos rotavirus da espécie A	19
1.2.7.1 Distribuição mundial dos genótipos de rotavirus da espécie A.....	20
1.2.7.2 Distribuição dos genótipos de rotavirus da espécie A no Brasil.....	21
1.2.7.3 Re-emergência do genótipo G2P[4].....	22
1.2.7.4 Prevenção e controle dos rotavírus da espécie A	25

1.3	Os Norovírus	27
1.3.1	Histórico	27
1.3.2	Classificação	28
1.3.3	Partícula viral.....	29
1.3.4	Genoma e proteínas virais.....	31
1.3.5	Biossíntese viral	33
1.3.6	Diagnóstico laboratorial	34
1.3.7	Epidemiologia.....	36
1.3.8	Prevenção e controle.....	38
2.	JUSTIFICATIVA.....	40
3.	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo geral	42
3.2	Objetivos específicos.....	42
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	Espécimes clínicos	43
4.2	Suspensão fecal.....	43
4.3	Ensaio imunoenzimático para a pesquisa de rotavírus da espécie A.....	43
4.4	Extração de ácidos nucleicos	43
4.5	Síntese de cDNA.....	44
4.6	Amplificação dos genes VP4, VP7 e NSP4 de rotavírus da espécie A	45
4.7	Amplificação do gene que codifica para a proteína VP7 por RT-PCR.....	46
4.8	Reação em cadeia pela polimerase em tempo real para detecção de norovírus dos Genogrupos I e II	47
4.9	Determinação dos genótipos de norovírus através da amplificação da região D por PCR.....	49
4.10	Iniciadores de cadeia utilizados nas reações de detecção e sequenciamento	50
4.11	Análise dos amplicons por eletroforese em gel de agarose a 1,5%	52
4.12	Purificação dos produtos amplificados para sequenciamento.....	53

4.13	Sequenciamento dos genes amplificados.....	53
4.14	Análise das sequências	53
5.	RESULTADOS	56
5.1	Detecção e perfil epidemiológico dos rotavírus da espécie A	56
5.2	Caracterização molecular dos rotavírus da espécie A detectados em Fortaleza, Ceará	60
5.2.1	Genotipagem das amostras.....	60
5.2.2	Amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP4, VP7 e NSP4 para análise por sequenciamento.....	61
5.2.3	Análise filogenética.....	63
5.2.4	Análise do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*)	63
5.2.5	Análise do gene que codifica para a proteína VP7	69
5.2.6	Análise do gene que codifica para a proteína NSP4	74
5.2.7	Mecanismos de diversidade genética	79
5.3	Detecção e perfil epidemiológico dos norovírus	81
5.3.1	Caracterização molecular dos norovírus detectados em Fortaleza, Ceará	85
5.3.2	Genotipagem dos norovírus detectados em Fortaleza, Ceará	86
5.3.3	Análise Filogenética das amostras positivas para norovírus	88
6.	Discussão	92
6.1	Prevalência e perfil genotípico de rotavírus da espécie A em Fortaleza, Ceará	92
6.1.1	Variabilidade genômica dos RVA detectados em Fortaleza, Ceará	94
6.2	Prevalência e perfil genotípico de norovírus em Fortaleza, Ceará	100
7.	Conclusões.....	105
8.	Referências Bibliográficas	106

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A – Adenina, base nitrogenada.

aa – Aminoácido

BLAST – Do inglês: *Basic Local Alignment Search Tool*

C – Citosina, base nitrogenada.

Ca²⁺ – Íon cálcio

cDNA – DNA complementar

Cl²⁻ – Íon cloro

dATP – Desoxiadenosina trifosfato

dCTP – Desoxicitidina trifosfato

dGTP – Desoxiguanosina trifosfato

DLP – Do inglês: *Doble Layer Particles* – Partículas virais de camada dupla

DMSO – Dimetil sulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dTTP – Desoxitimidina trifosfato

dXTP – Desoxiribonucleotídeos trifosfatados

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

EGPA – Eletroforese em gel de poliacrilamida

EI – Ensaio imunoenzimático

EUA – Estados Unidos da América

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

g – Grama

G – Guanina, base nitrogenada.

GA – Gastroenterite Aguda

H₂O – Água

HCl – Ácido clorídrico

Hsp – Do inglês: *heat shock protein* – Proteína de choque térmico

IME – Imunomicroscopia eletrônica

INF- α – Interferon alfa

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

IRF – Do inglês: *Interferon regulatory factors* - Fatores reguladores do Interferon

LVCA – Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental

M – Molar

MLP – Monofosforil lipídeo.

ME – Microscopia eletrônica

mg – Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL – Mililitro

mM – Milimolar

N – Normal

NaOH – Hidróxido de sódio

NCBI – Do inglês: *National Center for Biotechnology Information* – Centro Nacional de Informação em Biotecnologia

nm – Nanômetros

NSPs – Proteínas não-estruturais

nt – Nucleotídeos

°C – Graus Celsius

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

PA – Pró análise

pb – Pares de bases

PCR – Do inglês: *Polymerase chain reaction* – Reação em cadeia da polimerase

PNI – Programa Nacional de Imunização

RE – Retículo endoplasmático

RER – Retículo endoplasmático rugoso

RNA – Ácido ribonucléico

RNA (-) – RNA de polaridade negativa

RNA (+) – RNA de polaridade positiva

RNAdf – RNA dupla fita

RNA_m – RNA mensageiro

RT – Do inglês: *Reverse transcription* – Transcrição reversa

RT-PCR – Do inglês: *Reverse transcription-Polymerase chain reaction* – Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase

RV – Rotavírus

RVA – rotavírus da espécie A

T – Timina, base nitrogenada

TBE – Tris-Borato-EDTA

Tris – Hidroximetil-tris-aminometano

U/μL – Unidades por microlitro

UTR – Do inglês: *Untranslated region* - Região não traduzida

VLS – Do inglês: *Viroplasm-like structures* - Partículas similares a viroplasmas

VP5* – Subunidade peptídica VP5 gerado por proteólise de VP4

VP8* – Subunidade peptídica VP8 gerada por proteólise de VP4

VPs – Proteínas estruturais

μg/mL – Microgramas por mililitro

μL – Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Causas de mortalidade infantil no mundo	1
Figura 2. Esquema estrutural do genoma e partículas virais dos rotavírus.....	4
Figura 3: Aspectos estruturais da proteína VP4.	7
Figura 4: Projeção em três dimensões da interação de VP6 com VP2 e VP1 associada a VP3.....	8
Figura 5: Aspectos estruturais da proteína VP7..	9
Figura 6: Esquema da biossíntese dos RV	15
Figura 7. Eletroferotipos característicos das diferentes espécies de rotavírus.	16
Figura 8. Esquema representativo de um evento de recombinação genética.....	18
Figura 9. Esquema representativo de um evento de reassortment entre rotavírus da espécie A de origem humana e origem suíno	19
Figura 10. Estimativa da incidência de mortes por rotavírus da espécie A.	20
Figura 11. Distribuição dos genótipos de rotavírus da espécie A no Brasil.....	22
Figura 12. Taxa de detecção dos diferentes genótipos G de rotavírus A no Brasil.....	23
Figura 13. Distribuição dos genótipos de rotavírus da espécie A no Brasil entre 2005 e 2009	25
Figura 14. Classificação dos norovírus.....	29
Figura 15. Micrografia eletrônica de partículas de norovírus	30
Figura 16. Estrutura do capsídeo e da proteína capsídica VP1 dos norovírus.....	31
Figura 17. Organização do genoma dos norovírus.....	33
Figura 18 Esquema representativo das regiões alvo nos ensaios de PCR convencional e em tempo real para detecção e genotipagem dos norovírus.....	36
Figura 19. Distribuição anual relativa em porcentagem de detecção de rotavírus da espécie A, em Fortaleza, CE.	56
Figura 20. Distribuição geográfica das amostras positivas para rotavírus da espécie A na cidade de Fortaleza, CE.....	57
Figura 21. Percentual cumulativo da distribuição dos grupos etários das crianças que apresentaram espécimes clínicos positivos para rotavírus da espécie A	58
Figura 22. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produtos de RT-PCR semi-nested.	61

Figura 23. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de RT-PCR para os genes que codificam para as proteínas VP4 (VP8*), VP7 e NSP4 de rotavírus da espécie A.....	62
Figura 24. Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica parcial do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) de amostras de rotavírus da espécie A.....	66
Figura 25. Alinhamento das sequências parciais (281 aa) de aminoácidos da proteína VP4 (VP8*).....	68
Figura 26. Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica parcial da região codificante da proteína VP7.....	71
Figura 27. Alinhamento das sequências aminoacídicas parciais da proteína VP7.....	73
Figura 28. Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica completa do gene que codifica para a proteína NSP4.....	76
Figura 29. Alinhamento das sequências de aminoácidos completas da proteína NSP4.....	78
Figura 30. Distribuição anual relativa em porcentagem de detecção de norovírus em Fortaleza, CE.....	81
Figura 31. Distribuição geográfica das amostras positivas para norovírus coletadas na cidade de Fortaleza, CE.....	82
Figura 32. Percentual cumulativo da distribuição dos grupos etários das crianças que apresentaram espécimes clínicos positivos para norovírus.....	83
Figura 33. Eletroforese da reação de amplificação da região D do norovírus.....	86
Figura 34. Distribuição genotípica dos norovírus detectados em Fortaleza, CE.....	87
Figura 35: Distribuição anual dos casos de infecção por norovírus e estratificação dos genótipos detectados em Fortaleza, Ceará.....	88
Figura 36. Árvore filogenética baseada nas sequências nucleotídicas da região D de norovírus.....	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Mistura de reagentes utilizados na reação de transcrição reversa.....	45
Quadro 2. Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase para a amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP4, VP7 e NSP4.	46
Quadro 3. Reagentes utilizados para amplificação dos genes que codificam para a proteína VP7.....	47
Quadro 4. Oligonucleotídeos e sondas utilizados para detecção e quantificação dos norovírus.....	48
Quadro 5. Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase em tempo real.	49
Quadro 6. Reagentes utilizados na PCR para amplificação da região D dos norovírus.	50
Quadro 7. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes NSP4, VP4 e VP7 de rotavírus da espécie A.....	51
Quadro 8. Oligonucleotídeos utilizados para genotipagem das amostras positivas para norovírus.....	52
Quadro 9. Identidade nucleotídica e aminoacídica, baseada na sequência parcial do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) de amostras coletadas em Fortaleza, CE, de maio de 2008 a abril de 2009.....	67
Quadro 10. Identidade nucleotídica e de aminoácidos, baseada na sequência parcial do gene que codifica para a proteína VP7 de amostras coletadas em Fortaleza, CE, de maio de 2008 a abril de 2009.....	72
Quadro 11. Identidade nucleotídica e de aa do gene que codifica para a proteína NSP4 entre amostras cearenses de rotavírus da espécie A.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de corte da porcentagem de identidade nucleotídica que definem os diferentes genótipos de rotavírus da espécie A, considerando-se os 11 segmentos genômicos.	17
Tabela 2. Aminoácidos e suas respectivas abreviações.....	55
Tabela 3. Distribuição por grupo etário de casos de infecções por rotavírus da espécie A em crianças cearenses com gastroenterite aguda.....	58
Tabela 4. Manifestações clínicas, além de diarreia, relatadas pelos pacientes com infecção por rotavírus da espécie A.....	59
Tabela 5. Perfil dos genes que codificam para as proteínas VP4, VP7 e NSP4 de amostras analisadas neste estudo.....	80
Tabela 6: Distribuição por grupo etário dos casos de infecções por norovírus em crianças com gastroenterite aguda em Fortaleza, CE.....	83
Tabela 7: Manifestações clínicas, além de diarreia, relatadas pelos pacientes com infecção por norovírus.....	84
Tabela 8: Quantificação da carga viral de norovírus nas amostras coletadas em Fortaleza, CE.....	85



Ministério de Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Detecção e caracterização genotípica de rotavírus da espécie A e norovírus em amostras fecais humanas de Fortaleza, Ceará.

RESUMO
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ana Caroline Costa Sá

A gastroenterite aguda (GA) é uma causa importante de morbidade e mortalidade entre crianças com menos de cinco anos no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a GA e as infecções respiratórias agudas são os mais importantes agravos à saúde das crianças ≤ 5 anos, responsáveis por 17% das 10,4 milhões de mortes a cada ano. As GA causadas por rotavírus da espécie A (RVA) são responsáveis por aproximadamente 390.000 mortes ao ano, 80% dessas nos países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e na África. Os rotavírus são classificados em cinco espécies (A-E), sendo os da espécie A os principais agentes etiológicos da diarreia aguda em crianças menores de 5 anos. Pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*. Baseando-se nas proteínas de superfície, VP4 e VP7, os RVA são classificados em genótipos P e G, respectivamente. Estudos de epidemiologia molecular demonstraram que, mundialmente, cinco genótipos G são prevalentes: G1-4 e 9; em associação com os genótipos P[8], P[4] ou P[6]. Os norovírus (NoV), gênero *Norovirus* da família *Caliciviridae*, são amplamente reconhecidos como os principais agentes causadores de surtos de GA não bacteriana e como o segundo vírus mais prevalente em infecções esporádicas. Neste estudo, foi analisada a presença de RVA e NoV em 200 espécimes clínicos coletados de maio de 2008 a abril de 2009, em Fortaleza, Ceará. Os resultados revelaram 12% e 17% de prevalência para RVA e NoV, respectivamente. Todas as amostras positivas para RVA pertencem ao genótipo G2P[4], sugerindo a predominância deste genótipo. Diferentes estudos realizados em vários Estados brasileiros revelaram que o genótipo G2P[4] é o mais prevalente desde 2005. Entretanto, foi demonstrado que existem flutuações, tanto temporais quanto geográficas, das combinações G-P de RVA circulantes. As análises filogenéticas permitiram identificar 3 variantes do gene que codifica para a proteína VP7, 2 variantes do gene que codifica a proteína VP4, 3 variantes do gene que codifica para a proteína NSP4, demonstrando a segregação independente dos genes de RV-A analisados. Em 2009, uma nova variante foi identificada. Dos mecanismos de geração de diversidade em RVA, foi possível evidenciar a ocorrência de: *i*) mutações pontuais; *ii*) *reassortment* entre amostras humanas; *iii*) *reassortment* entre amostras humanas e amostras bovinas para o gene que codifica para a proteína NSP4. Dentre os NoV, foram detectados os seguintes genótipos GII.4 (59%), GII.12 (17%), GII.6 (9%), GII.3 (6%) e GII.? (9%). O genótipo GII.4 foi predominante, seguido de GII.12, corroborando o fenômeno de emergência deste, descrito mundialmente a partir de 2008. Os resultados aqui apresentados mostram que os RVA e os NoV são importantes causas de GA no Estado do Ceará e o acompanhamento contínuo da epidemiologia destes vírus, em diferentes regiões do Brasil, será essencial para determinar o impacto real destas infecções no país.



Ministério de Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Detecção e caracterização genotípica de rotavírus da espécie A e norovírus em amostras fecais humanas de Fortaleza, Ceará.

ABSTRACT
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ana Caroline Costa Sá

Acute gastroenteritis (AGE) is an important cause of morbidity and mortality of children <5 years old worldwide. According to WHO, AGE and the acute respiratory infections are the most important health problems in 5-year-old children, being responsible of 17% of 10.4 million of death every year. AGE caused by Rotavirus species A (RVA) are responsible for approximately 390,000 deaths annually, 80% of those in developing countries, mainly in Asia and Africa. Rotaviruses are classified into five species (A-E) and species A constitute the most important etiological agent of acute diarrhea in children with less than 5 years old. Based on surface proteins, VP4 and VP7, RVA are classified as genotype P and G, respectively. Molecular epidemiology studies have shown that five G genotypes are prevalent worldwide: G1, G2, G3, G4 and G9, in association with the genotypes P[8], P[4] or P[6]. Noroviruses (NoV), gender *Norovirus* from the *Caliciviridae* family, are widely recognized as the most important causative agents of non-bacterial AGE outbreaks and the second most prevalent viruses in sporadic infections. In this study, we screened the presence of RVA and NoV in 200 fecal samples originated from clinical specimens in Fortaleza, Ceará collected from May 2008 to April 2009. The results obtained revealed prevalence of 12% and 17% for RVA and NoV, respectively. All positive samples for RVA belong to P[4]G2 genotype, suggesting the predominance of this genotype. Studies in various Brazilian states showed that the genotype P[4]G2 is the most prevalent since 2005. However, it was shown that there are fluctuations, both temporal and geographic, on the circulating RVA genotypes. Phylogenetic analyzes have identified 3 variants of the VP7, 2 variants of the VP4 gene, 3 variants of the NSP4 gene, demonstrating the independent assortment of the RVA genes analyzed. In 2009, a new variant was identified. Between the mechanisms of diversity generation in RVA, it was possible to demonstrate the occurrence of: *i*) mutations *ii*) reassortment between human samples *iii*) reassortment between human and bovine samples, regarding NSP4 gene analysis. Among NoV, the following genotypes were detected: GII.4 (59%), GII.12 (17%), GII.6 (9%), GII.3 (6%) and GII.? (9%). The genotype GII.4 was predominant, followed by GII.12, corroborating its global emergency, described since 2008. The results presented here show that RVA and NoV are important causes of AGE in Ceará State and its continuous monitoring in different regions of Brazil will be essential to determine their real impact in AGE infections in Brazil.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gastroenterite aguda de etiologia viral

A gastroenterite aguda (GA) é uma síndrome caracterizada por diarreia (aumento da frequência e/ou diminuição da consistência das evacuações) associada a náuseas, vômitos e desconforto abdominal. Os fatores causais podem ser múltiplos; mas, geralmente, a GA é oriunda de infecção (CDC 2011a).

A GA constitui a segunda maior causa de morbidade e mortalidade em crianças menores que cinco anos, particularmente nos países em desenvolvimento (**Figura 1**). Nestes países, a introdução da Terapia de Reidratação Oral (TRO), a implementação do uso de vitamina A, a melhoria das condições de saneamento e de acesso à água potável, assim como os programas de imunização implementados reduziram os casos de mortalidade associados à GA de 4,5 milhões, na década de 1980, para 1,3 milhão em 2008 (Black *et al.*, 2010).

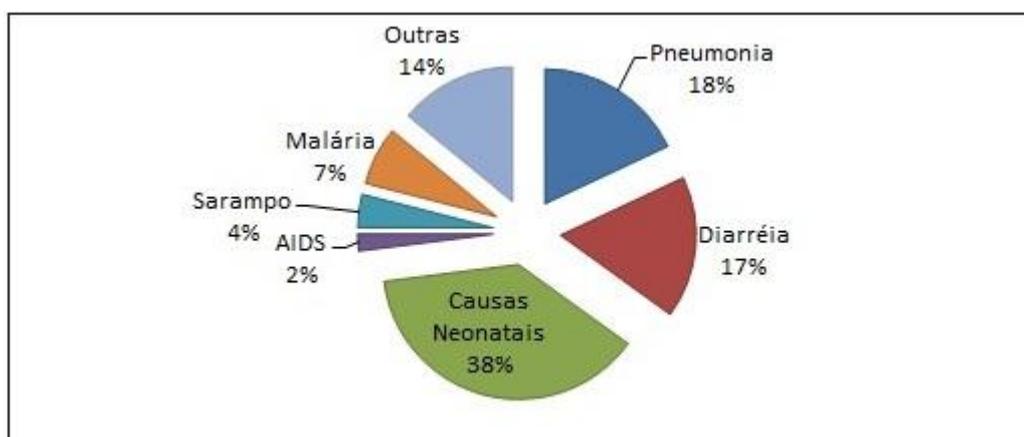


Figura 1. Causas de mortalidade infantil no mundo (Adaptada de WHO, 2009).

Entretanto, este número é considerado inaceitável pela Organização das Nações Unidas (ONU), que estabeleceu como meta a redução de 2/3 dos casos de mortalidade associados à GA para o ano de 2015 (WHO, 2009). Com esta finalidade, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) publicaram um guia, em 2009,

visando a redução da morbidade e da mortalidade da GA para que o objetivo da ONU seja alcançado.

Dentre os agentes etiológicos associados à GA, destacam-se os vírus pelo aumento expressivo no número de hospitalizações na última década. Os rotavírus, os calicivírus humanos (norovírus e sapovírus), os adenovírus entéricos e os astrovírus são os principais causadores desta patologia (SVS, 2010).

Os rotavírus da espécie A (RVA) são os principais agentes etiológicos causadores da GA e, anualmente, são responsáveis por aproximadamente 111 milhões de episódios de diarreia, 25 milhões de visitas ambulatoriais, dois milhões de hospitalizações e 400.000 mortes (associadas à desnutrição) de crianças menores de cinco anos de idade, principalmente na África, América Latina e Ásia (Chandran *et al.*, 2010). Isto reflete que, até os 5 anos de idade, virtualmente, todas as crianças experimentaram pelo menos um episódio de GA por RVA, uma em 5 foi atendida em ambulatórios e uma em 65 foi hospitalizada em decorrência de GA causada por RVA (Parashar *et al.*, 2006).

Os norovírus (NoV) são reconhecidos mundialmente como importantes agentes etiológicos de surtos de GA, que ocorrem principalmente como resultado da contaminação de alimentos e água. Atualmente, acredita-se que os NoV são responsáveis por 90% dos surtos de GA virais no mundo, contabilizando um milhão de hospitalizações e 218.000 mortes em crianças de países em desenvolvimento (Patel *et al.*, 2008).

A transmissão da GA ocorre principalmente pela ingestão de alimentos e água contaminados, contato íntimo com pessoas infectadas ou com objetos que entraram em contato com o patógeno. O diagnóstico é feito pela análise clínica dos sintomas e exames laboratoriais. Em casos nos quais o vômito e/ou diarreia sejam persistentes, é preconizada a reidratação intravenosa (SVS, 2010).

1.2 Os rotavírus da espécie A

1.2.1 Histórico

A descoberta dos rotavírus (RV) humanos por Bishop e colaboradores (1973) revolucionou o conhecimento microbiológico da GA. Até aquele momento, a etiologia de mais de 80% dos casos de GA era desconhecida. Por intermédio da microscopia eletrônica (ME), Bishop e colaboradores demonstraram a presença de vesículas citoplasmáticas com partículas virais semelhantes aos Orbivírus. O mesmo foi encontrado por Flewett e colaboradores (1973) no material fecal de crianças com diarreia.

Inicialmente, estes vírus receberam denominação de *Orbivirus-like agent* (Bishop *et al.*, 1973), de *Reovirus-like agent* (Kapikian *et al.*, 1974) e, considerando a visualização da dupla camada protéica, de Duovirus (Davidson *et al.*, 1975).

Posteriormente, foi proposto que estes constituíssem um novo gênero (*Rotavírus*), na família *Reoviridae*, pelo aspecto semelhante ao de roda (do latim *rota*), quando a partícula viral é observada em contraste negativo em ME (Flewett & Wood, 1978).

No Brasil, a primeira detecção dos RV ocorreu em 1976, reportada por Linhares e colaboradores (1977). Desde então, vários artigos demonstram o impacto dos RV na etiologia da GA no país. (Linhares *et al.*, 1989; Pereira *et al.*, 1993; Timenetsky *et al.*, 1994; Leite *et al.*, 1996a; Leite *et al.*, 2008; Carvalho-Costa *et al.*, 2011; Linhares *et al.*, 2011).

1.2.2 A partícula viral

O vírion, partícula viral completa e infecciosa dos RV, caracteriza-se como não-envelopado. Este apresenta, aproximadamente, 80 nm de diâmetro, considerando as suas projeções, e estrutura constituída por duas camadas protéicas de simetria icosaédrica e genoma composto por 11 segmentos de RNA dupla fita (RNA_{df}) (*ICTVdB Virus Code*: 00.060.0.03). Dentre as proteínas codificadas por esses segmentos, seis são estruturais: VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7; e seis não estruturais: NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6 (Estes & Kapikian, 2007).

Ancorando o RNA_{df}, encontram-se as proteínas constituintes do *core*, VP1, VP2 e VP3, que juntas contabilizam 18% da massa proteica da partícula e são funcionalmente importantes para a replicação do material genético dos RV. Estas proteínas são codificadas pelos segmentos 1, 2 e 3, respectivamente. Além destas, o capsídeo interno é formado pela proteína VP6 (codificada pelo segmento 6), que é a mais abundante e, estruturalmente, importante para proteger o RNA_{df} (Estes & Kapikian, 2007).

Compondo o capsídeo externo, encontram-se as proteínas estruturais: VP4, codificada pelo gene 4 e responsável pela classificação em sorotipos/genótipos **P**; e VP7, codificada pelos genes 7 (Rhesus sp.), 8 (rotavírus bovino UK) ou 9 (SA-11, rotavírus símio), determinante dos sorotipos/genótipos **G**. Outras cinco proteínas não-estruturais são codificadas pelos segmentos genômicos 5, 7,8,10 e 11, sendo assim denominadas, respectivamente: NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 e NSP5 (Estes & Kapikian, 2007).

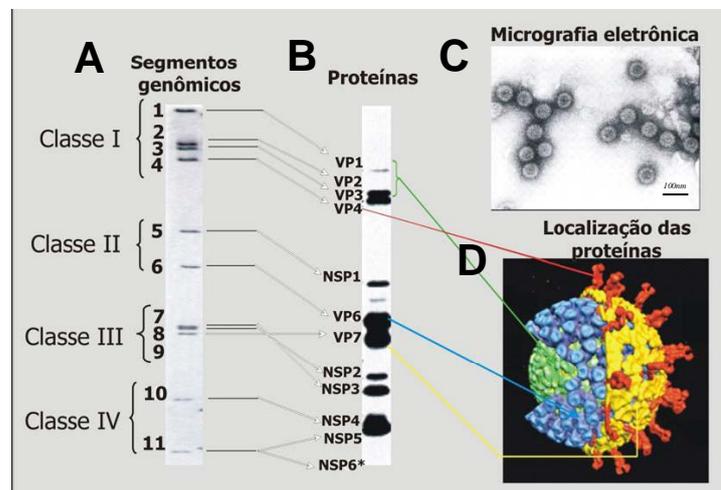


Figura 2. Esquema estrutural do genoma e partículas virais dos rotavírus. A: Eletroforese em gel de poliácridamida dos 11 segmentos do genoma do rotavírus da espécie A de origem símia (SA-11). B: Gel de poliácridamida para visualização das diferentes proteínas estruturais (VP1 – VP4, VP6 – VP7) e não estruturais (NSP1 – NSP6) de SA-11. C: Micrografia eletrônica de rotavírus. D: Reconstrução em 3 dimensões do vírion de SA-11 (Adaptada de Conner & Ramig, 1997).

1.2.3 Proteínas estruturais dos rotavírus

1.2.4.1 VP1

Conhecida pela sua função de RNA-polimerase dependente de RNA, a VP1 é a proteína menos abundante dentre as que compõem o capsídeo viral. Quando unida às proteínas VP2 e VP3, compõem o complexo de replicação, que tem papel fundamental na biossíntese viral (Arnoldi *et al.*, 2007). Dentre as proteínas constituintes do *core*, esta é a única que possui reconhecimento de uma sequência específica de RNA composta por regiões conservadas com quatro bases (UGUG) na extremidade nucleotídica 3' (Lu *et al.*, 2008).

1.2.4.2 VP2

É a proteína mais abundante do *core* viral. Faz parte do complexo de replicação e liga-se tanto à VP1 quanto à VP3, através de um domínio na sua porção N-terminal. A interação protéica entre VP1, 2 e 3 é um fator limitante na replicação e transcrição do genoma viral (McDonald *et al.*, 2009a).

Além disso, a superfície externa da proteína VP2 interage com a proteína VP6 nos estágios iniciais da morfogênese viral. A interação entre VP2 e VP6 é fundamental para a formação de partículas consideradas imaturas ou incompletas, isto é, aquelas que possuem apenas duplo capsídeo protéico (DLPs). Esta interação também demonstra importância na atividade transcricional da partícula completa que será formada (Estes & Kapikian, 2007).

1.2.4.3 VP3

Atualmente, sabe-se que esta proteína demonstra atividades guanidil e metiltransferase e que a sua função na morfogênese dos RV é de enzima de capeamento de RNA (Patton, 1995; Subodh *et al.*, 2006; McDonald & Patton, 2011). Dessa forma, a VP3 é responsável por modificar a extremidade 5' da

molécula de RNA e gerar uma estrutura de capeamento similar a encontrada no RNAm de eucariotos (McDonald & Patton, 2011).

1.2.4.4 VP4

A proteína VP4 é não glicosilada e forma protuberâncias espiculares a partir do capsídeo externo em partículas virais maduras. Esta proteína demonstra ter papel essencial no ciclo replicativo viral, não só pela adesão e internalização à célula, mas também hemaglutinação, neutralização e virulência (Dunn *et al.*, 1995; Ludert *et al.*, 1996). Esta proteína é susceptível à proteólise, o que resulta na exposição de sítios ativos que proporcionam a penetração do vírus na célula (Arias *et al.*, 1996; Estes & Kapikian, 2007).

Na presença de tripsina, VP4 é clivada nos polipeptídeos VP5* e VP8*, permanecendo associados ao vírion. VP5* tem atividade de neutralização cruzada entre os diferentes tipos de VP4 e, possivelmente, possui os epítomos responsáveis pela adsorção do vírus à célula (Kirkwood *et al.*, 1996). Além disso, já foi demonstrado que algumas estirpes de RVA interagem com integrinas ou proteínas choque térmico antes ou após à ligação a célula hospedeira (Guerrero *et al.*, 2000; Zárate *et al.*, 2003). A VP8* contém a maioria dos epítomos associados às reações tipo-específicas, dependentes da ligação deste polipeptídeo com ácido siálico (Isa *et al.*, 1997). Quatro epítomos de neutralização foram mapeados em VP8* e um epítomo em VP5* (Kovacs-Nolan *et al.*, 2003) (**Figura 3**).

Em virtude da especificidade da proteína VP4 no processo de reconhecimento da célula hospedeira, o domínio de união a carboidrato de VP8* é considerado um alvo importante para o desenvolvimento de medicamentos antivirais. Alguns estudos agregam informações estruturais contundentes sobre a subunidade VP8* (Kraschnefski *et al.*, 2005; Dormitzer *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2005; Monnier *et al.*, 2006).

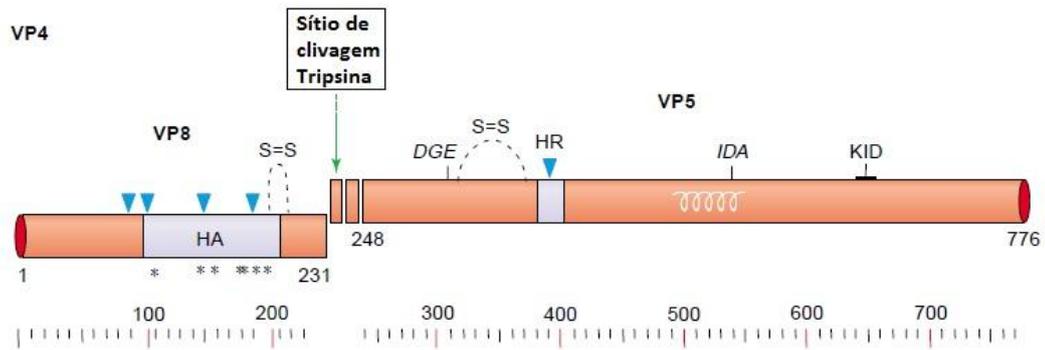


Figura 3: Aspectos estruturais da proteína VP4. Esquema representativo dos aspectos estruturais da proteína VP4 de Rotavírus Rhesus (RRV) com 776 aminoácidos e vários domínios estruturais importantes. A seta verde indica o sítio de clivagem proteolítica. Em VP8*, HA representa o domínio de hemaglutinação. Asteriscos indicam a posição dos aminoácidos responsáveis pela ligação ao Ácido Siálico. As setas azuis apontam para os epítomos de neutralização mapeados. A região hidrofóbica (HR) foi demonstrada como importante domínio de fusão (adaptada de Lopez & Arias, 2004).

1.2.4.5 VP6

É a proteína viral mais abundante dos RV (aproximadamente 51% da partícula viral) e possui, na superfície, determinantes antigênicos altamente conservados que permitem a classificação dos RV em diferentes espécies (A-E) e subgrupos de RVA (I, II, I+II, não-I e não-II) (Estes & Kapikian, 2007). Durante uma infecção por RVA, a maioria dos anticorpos produzidos pelo indivíduo é direcionada contra VP6, possivelmente por causa de sua abundância no capsídeo viral (Svensson *et al.*, 1987). Pelo mesmo motivo, VP6 mostra-se, atualmente, como um alvo importante para o desenvolvimento de vacinas (Ward & McNeal, 2010).

A VP6 é constituinte do capsídeo intermediário e é formada por dois domínios: um que interage com VP7 e VP4 do capsídeo externo; e outro que interage com VP2 do *core*. Assim, VP6 participa em duas funções importantes do vírus: *i*) adsorção e penetração na célula; *ii*) transcrição do RNAdf (Heiman *et al.*, 2008).

Canais aquosos permeiam as camadas de VP6 e VP2, possibilitando o acesso de cátions bivalentes e nucleotídeos ao interior da partícula viral, além da saída do RNAm (McClain *et al.*, 2010) (**Figura 4**). O domínio de

trimerização de VP6 com VP7 e VP4 e VP2 situa-se entre os aminoácidos (aa) 246 e 315. Os resíduos 296 a 299 e 305, são importantes no reconhecimento pelos anticorpos monoclonais 255/60 determinantes de subgrupo (Estes & Kapikian *et al.*, 2007).

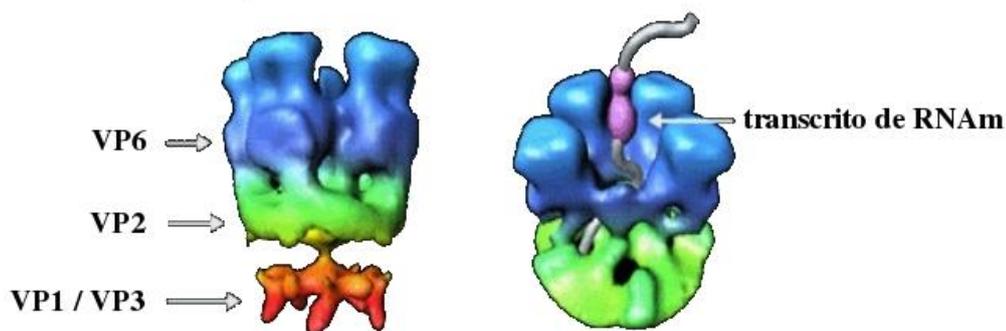


Figura 4: Projeção em três dimensões da interação de VP6 com VP2 e VP1 associada a VP3. (A) Complexo proteico de VP1, 2,3 e 6 vista longitudinalmente. (B) Detalhe do canal existente entre VP6 e VP2 para a passagem do RNA mensageiro transcrito (Adaptada de Lawton *et al.*, 1997).

1.2.4.6 VP7

A glicoproteína VP7 é a mais imunogênica dentre as constituintes do capsídeo externo e é responsável pela síntese de anticorpos neutralizantes (Estes & Kapikian, 2007). VP7 modula a atividade de VP4 no processo de adsorção e entrada dos RV na célula, interagindo com proteínas da família das integrinas, na superfície celular, após o processo de adsorção mediado por VP4 (Guerrero *et al.*, 2000).

Íons Ca^{2+} , em concentrações apropriadas, são necessários para 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 em VP4, que possibilita a entrada do vírion na célula. Aoki e colaboradores (2009) demonstraram que anticorpos neutralizantes contra a proteína VP7 estabilizam o trímero formado pela proteína, inibindo as alterações em VP4, necessárias para permitir a entrada do vírus na célula hospedeira.

O gene que codifica para VP7 dispõe de uma fase de leitura aberta (ORF) composta por uma sequência nucleotídica que codifica para 326 aa (**Figura 5**). Cada região é precedida por domínios hidrofóbicos designados de H1 (aa 6 a 23) e H2 (aa 33 a 44), que sinalizam a migração da proteína imatura para o retículo endoplasmático (RE). Um terceiro códon de iniciação também está presente anteriormente ao segundo domínio hidrofóbico. Algumas estirpes de RVA apresentam até três sítios potenciais de glicosilação. Contudo, somente dois destes são de fato glicosilados (Estes & Kapikian, 2007).

Análises da sequência nucleotídica do gene que codifica para esta proteína, relatam 9 regiões variáveis (VR1 – VR9), sendo 4 destas consideradas sítios antigênicos importantes: região A (aa 87 – 101), região B (aa 143 – 152), região C (aa 208 – 223) e região F (aa 235 – 242) (Kirkwood *et al.*, 1993).

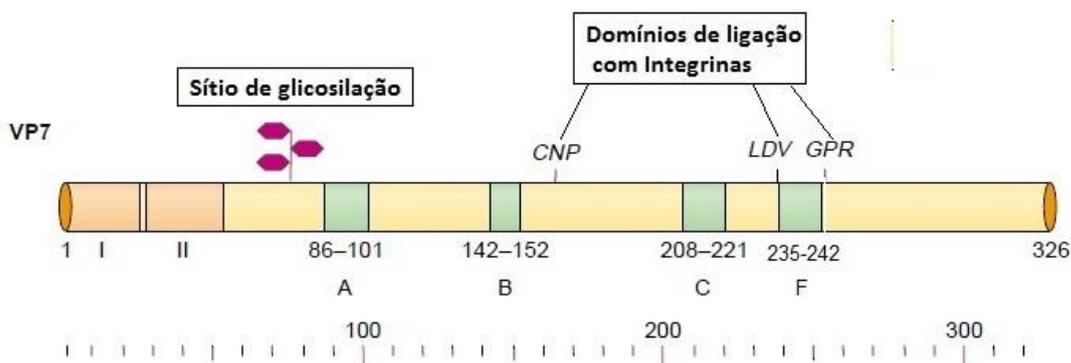


Figura 5: Aspectos estruturais da proteína VP7. Esquema representativo dos aspectos estruturais da proteína VP7 de Rhesus Rotavírus (RRV) com 326 aminoácidos e vários domínios estruturais relevantes. I e II denotam as duas regiões hidrofóbicas N-terminais da proteína. O sítio de glicosilação está representado pelas três formas hexágonas. CNP, LDV e GPR são os domínios de ligação a proteínas da família das Integrinas, responsáveis pela entrada do vírus na célula. A, B, C e F indicam os epítomos de neutralização mapeados. (adaptada de López & Arias, 2004).

1.2.4 Proteínas não estruturais dos rotavírus

1.2.4.1 NSP1

Esta é a proteína viral menos conservada, demonstrando graus de variabilidade superiores aos de VP4 e VP7 (Dunn *et al.*, 1995). Na

morfogênese viral, encontra-se associada ao citoesqueleto celular favorecendo a ligação vírus-célula (James *et al.*, 1999). Além disso, NSP1 apresenta a peculiar função de moduladora da ativação de interferon (IFN) tipo I. A produção de IFN é crítica para encadear uma resposta imune inespecífica em casos de infecção viral. NSP1 antagoniza a resposta imune, via indução da degradação de um ou mais componentes necessários para expressão do tipo I de IFN, via fatores regulatórios do IFN 3, 5 e 7 (IFRs) ou via fatores nucleares $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$) (Barro & Patton, 2005; Graff *et al.*, 2009). Estudos demonstram que dependendo da estirpe de RVA, o mecanismo efetor de NSP1 é diferente (Arnold & Patton, 2011).

1.2.4.2 NSP2

Esta proteína é frequentemente encontrada associada a NSP5 e, dessa forma, são responsáveis pelas funções de transcrição, tradução, replicação e empacotamento do RNAfd. Sua localização na célula está associada ao viroplasma, que é uma região eletrodensa do citoplasma, adjacente ao RE, onde ocorre o processamento genômico. NSP2 é altamente conservada e expressa em altas concentrações nas células infectadas (Estes & Kapikian, 2007). A NSP2 possui ainda atividades helicase e NTPase, dependentes de íons Mg^{2+} (Taraporewala *et al.*, 1999).

1.2.4.3 NSP3

Esta proteína está diretamente vinculada ao processo de tradução do RNA viral. Quando em conformação de homodímero, reconhece a sequência consenso 3' do RNA mensageiro (RNAm), formando um complexo estável que favorece a tradução dos transcritos de RNAm pelos ribossomos. Esta forte ligação de NSP3 com o RNAm proporciona também a sua proteção contra nucleases celulares (Wentz *et al.*, 1996).

1.2.4.4 NSP4

Muitos estudos demonstram a multifuncionalidade desta proteína que foi a primeira enterotoxina viral descrita como diretamente responsável pelas manifestações clínicas mais recorrentes aos RV (Ball *et al.*, 1996). O peptídeo correspondente aos resíduos de aa de 48 a 91 de NSP4 é capaz de promover uma desestabilização da membrana do RE, provocando sua lise e resultando em um aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Conseqüentemente, há um aumento de secreção de íons cloro (Cl^-), ocasionando diarreia de natureza secretória. Adicionalmente, alterações nos resíduos de aa nas posições 114 até 135 da NSP4 podem levar a mudanças na atividade toxigênica dos RV (Bowman *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2004).

A proteína NSP4 mimetiza os secretagogos intestinais e, dessa forma, ativa o reflexo secretor do Sistema Nervoso Entérico (SNE), pela correlação do influxo de Ca^{2+} na membrana plasmática, que é regulado por canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes. A ativação de SNE ocorre pela liberação de prostaglandinas, peptídeos sinalizadores, citocinas e da enterotoxina viral NSP4 ocasionando o aumento da motilidade intestinal (Boshuizen *et al.*, 2004).

Outra funcionalidade de NSP4 descrita na literatura é o desarranjo das zonas de oclusão, isto é, a região entre duas células que apresenta membrana impermeável. Na situação de infecção por RV, NSP4 aumenta a permeabilidade paracelular, permitindo a passagem de macromoléculas de até 20kDa (Tafazoli *et al.*, 2001).

Na morfogênese do vírus, a extremidade C-terminal de NSP4 atua como receptor intracelular, na membrana do RE, e liga-se a VP6, que reveste as DLPs, possibilitando o revestimento destas partículas com a camada mais externa, formada por VP4 e VP7. Além disso, a NSP4 também participa do processo de transporte destas partículas através das membranas do RE durante a montagem de partículas maduras (Taylor & Bellamy, 2003).

Os anticorpos neutralizantes dirigidos contra NSP4 reduzem a capacidade desta proteína em acarretar diarreia. Em um estudo com camundongos vacinados com esta proteína, foi observada a indução de proteção homotípica e heterotípica contra diarreia por RVA. Em humanos, a

NSP4 foi descrita como sendo capaz de induzir repostas imune celular e humoral (Johansen *et al.*, 1999).

Alguns estudos demonstram diferenças entre sequências de NSP4 de RVA em casos de infecção sintomática e assintomática em humanos (Kirkwood *et al.* 1999; Pager *et al.* 2000), outros estudos demonstraram que não existiria tal correlação (Araújo *et al.*, 2007; Mascarenhas *et al.* 2007).

1.2.4.5 NSP5

Esta proteína possui atividade autoquinase e em células infectadas apresenta formas hipo e hiper fosforiladas (Taraporewala & Patton, 2004). Durante o processo de replicação, NSP2, NSP5 e NSP6 estão associadas à formação do viroplasma (Estes & Kapikian, 2007). Na ausência de outras proteínas virais, a interação entre NSP2 e NSP5 resulta em partículas defectivas semelhantes a *Virus-like Particles* (VLP) *in vitro*. Ambos os domínios N- e C-Terminais, encontram-se implicados na formação das VLPs (Fabbretti *et al.*, 1999).

1.2.4.6 NSP6

A NSP6 é encontrada principalmente no viroplasma e interage com NSP5 (Estes & Kapikian, 2007). Algumas variantes de RVA não codificam esta proteína e outras apresentam baixos níveis de expressão, que indicam que NSP6 apresenta papel regulatório não essencial na replicação viral (Taraporewala & Patton, 2004; López *et al.*, 2005).

1.2.5 Biossíntese viral

A biossíntese dos RVA ocorre no citoplasma das células absortivas diferenciadas, que se encontram na porção apical das vilosidades do intestino delgado. As partículas infecciosas são liberadas no lúmen intestinal e o processo replicativo continua na área distal do intestino delgado (Estes & Kapikian, 2007).

Em cultura de células, a infecciosidade dos RVA é aumentada pela presença da enzima proteolítica tripsina, que promove clivagem da proteína VP4, separando-a em duas subunidades: VP5* e VP8*, que permanecem acopladas à partícula viral (Kirkwood *et al.*, 1996). No lúmen intestinal do hospedeiro, essa enzima tem origem na liberação de secreções pancreáticas.

A entrada dos RVA na célula é possível por meio da ligação da subunidade VP8* ao ácido siálico e da interação de VP5* com integrinas e proteínas choque térmico (Hsp) (Guerrero *et al.*, 2000; Zárate *et al.*, 2003). Além disso, concentrações apropriadas de íons Ca^{2+} são necessárias para manter a estabilidade da partícula viral e, principalmente, a estabilidade de VP7. A remoção dos íons Ca^{2+} dissocia os trímeros de VP7 em monômeros, liberando a VP7 do virion e iniciando a penetração induzida por mudanças conformacionais que ocorrem na proteína VP4 (Aoki *et al.*, 2009).

Após a adsorção à célula hospedeira, ocorre a penetração do vírus no citoplasma celular (**Figura 6**). O mecanismo de penetração viral ainda não foi totalmente esclarecido. Entretanto, são propostos os mecanismos: *i*) endocitose mediada por receptor (Estes & Kapikian, 2007); *ii*) penetração direta por meio de *rafts* lipídicos, que são microdomínios lipídicos com alta densidade de glicoesfingolipídeos (moléculas com preponderância de cadeias hidrocarbonadas) e um conjunto específico de proteínas, tais como Hsp e integrinas. Possivelmente, mais de um mecanismo de penetração viral atuam nos RVA, como já foi descrito para outros vírus, entre os quais adenovírus, poliovírus e os reovírus (Isa *et al.*, 2004).

No citoplasma, ocorre a perda do capsídeo externo liberando DLPs. Este evento sinaliza para a proteína VP1, RNA-polimerase dependente de RNA, o momento de início da transcrição do material genético, produzindo as fitas RNA de polaridade positiva (RNA+). Estas servirão como fita molde para síntese de novas moléculas de RNAm e tradução das proteínas virais, estruturais e não-estruturais. As proteínas sintetizadas e o RNA fita simples (RNAfs) viral são reunidos no citoplasma da célula infectada, constituindo um material amorfo denominado viroplasma (Estes & Kapikian, 2007).

O capsídeo intermediário (VP6) envolve o *core* (RNAfs, VP1-VP3) formando a partícula viral incompleta, com aproximadamente 50 nm de diâmetro (DLPs). Nesta etapa, VP1-3 sintetizam a fita de polaridade negativa, completando a segunda fita do RNA_{df} dos RVA. Assim, as DLPs deixam o viroplasma e seguem para o RE Rugoso (RER), adquirindo o capsídeo e um envoltório transitório. As proteínas do capsídeo externo são sintetizadas nos poliribossomas do RER. As proteínas glicosiladas VP7 e NSP4 são sintetizadas em associação com o RE. A camada de VP7 forma o capsídeo externo e a NSP4 possui domínio citoplasmático que ancora as DLPs, por intermédio de VP6 e VP4, propiciando o brotamento das DLPs para o interior do RE. Pouco depois ocorre a montagem das partículas com capsídeo externo, resultando em partículas virais maduras com diâmetro aproximado de 80 nm. Finalmente, o ciclo infeccioso termina quando a progênie viral é liberada por lise da célula hospedeira (McDonald & Patton, 2011).

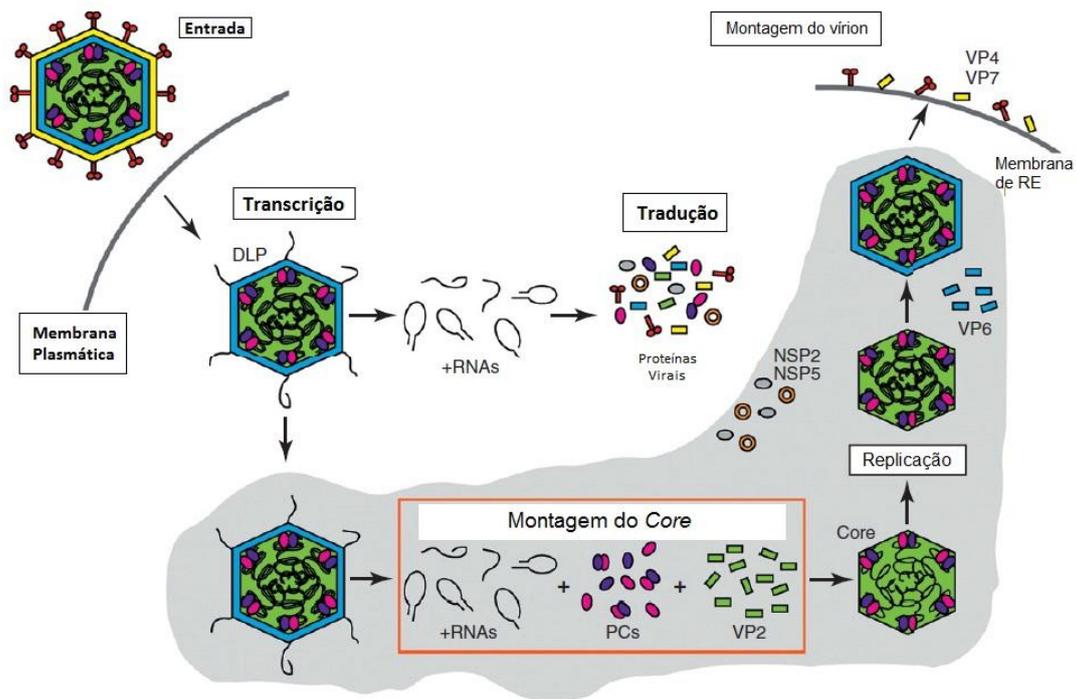


Figura 6: Esquema da biossíntese dos rotavírus (adaptada de McDonald & Patton, 2011).

1.2.6 Classificação dos rotavírus da espécie A

Os RVA pertencem à família *Reoviridae*, que possui 11 gêneros, dentre eles *Rotavirus*. Este gênero apresenta cinco espécies distintas, A a E, com base nos diferentes epítomos encontrados na proteína VP6. As espécies A, B e C são descritas em humanos e em animais, diferentemente das espécies D e E, que até o momento foram identificadas apenas em animais. Cada espécie apresenta um perfil característico quando submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) (**Figura 7**) (Estes & Kapikian *et al.*, 2007). Os RVA são epidemiologicamente mais importantes, sendo o principal responsável pelos episódios de GA em crianças menores que cinco anos de idade em todo o mundo (Parashar *et al.*, 2006).

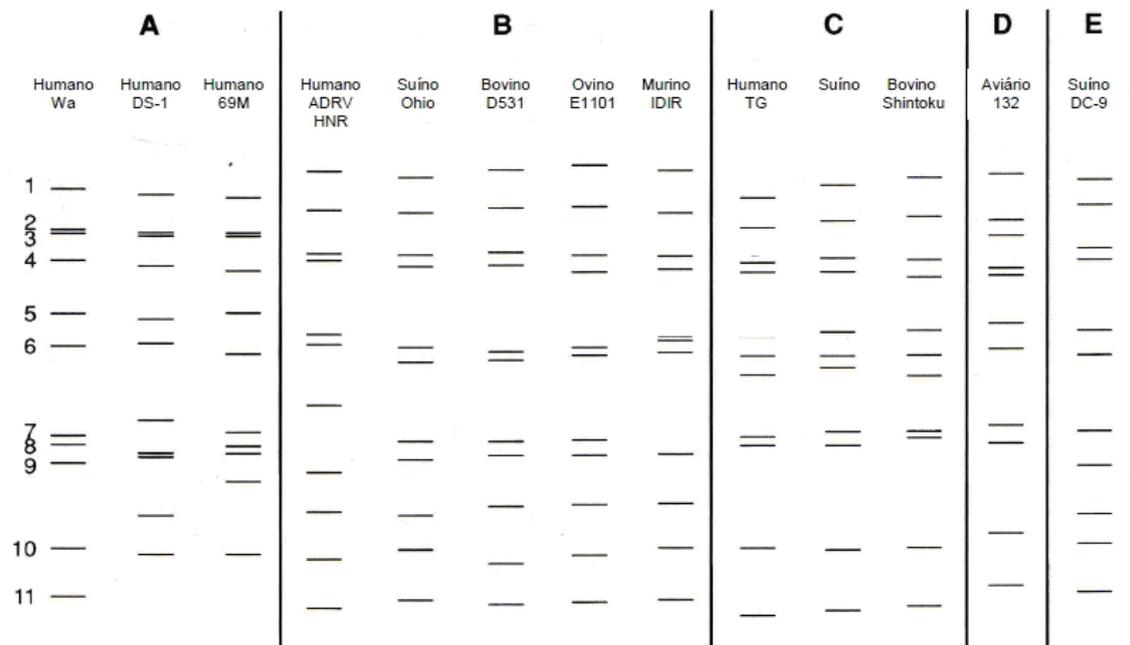


Figura 7. Eletroferotipos característicos das diferentes espécies de rotavírus. Esquema representativo dos eletroferotipos das diferentes espécies de rotavírus analisados em gel de poliacrilamida (Adaptada de Kapikian *et al.*, 2001).

Com base na especificidade antigênica das proteínas do capsídeo externo, os RVA apresentam um sistema de classificação binária que considera os genes que codificam para as proteínas VP4 (genótipos “P”) e VP7 (genótipos “G”) (Santos & Soares, 2008). Até o momento, foram descritos 27 genótipos G e 35 genótipos P (Matthijnssen *et al.*, 2011). O número de possíveis combinações (945) entre G e P é bem maior do que os genótipos descritos até o momento.

Recentemente, uma nova classificação dos RVA foi proposta, recomendando o sequenciamento de todo o genoma viral, baseado na caracterização molecular e análise filogenética do genoma completo de 53 protótipos. Os diferentes genótipos descritos para cada um dos segmentos são divididos segundo valores de corte, de acordo com a similaridade nucleotídica (**Tabela 1**). Os autores desta proposta acreditam que ela proporcionará melhor avaliação da diversidade genética, das estratégias evolutivas, dos perfis replicativos e de virulência, para o estudo da epidemiologia destes vírus (Matthijnssens *et al.*, 2008; 2011).

Tabela 1. Valores de corte da porcentagem de identidade nucleotídica que definem os diferentes genótipos de rotavírus da espécie A, considerando-se os 11 segmentos genômicos (Adaptada de Matthijssens *et al.*, 2011).

Gene	Valor de cut-off de identidade nucleotídica (%)	Genótipos	Designação dos nomes do genótipos
VP7	80	27G	Glicoproteína
VP4	80	35P	Sensível a Protease (Tripsina)
VP6	85	16I	Capsídeo Interno
VP1	83	R9	RNA polimerase Dependente de RNA
VP2	84	C9	Proteína do Core
VP3	81	M8	Metiltransferase
NSP1	79	A16	Antagonista do Interferon
NSP2	85	N9	NTPase
NSP3	85	T12	Promotor Traducional
NSP4	85	E14	Enterotoxina
NSP5	91	H11	Fosfoproteína

1.2.6 A Dinâmica Evolutiva dos rotavírus da espécie A

A diversidade genética dos RVA está associada a diferentes mecanismos de evolução: mutação pontual, rearranjo genômico (recombinação intramolecular) e reestruturação (*reassortment*) (Taniguchi & Urasawa, 1995; Desselberger, 1996).

O acúmulo de mutações pontuais pode ser evidenciado por técnicas de sequenciamento nucleotídico. Estas mutações definem novas linhagens e sublinhagens de um genótipo. Dessa forma, torna-se fundamental a análise sistemática de sequências dos vírus circulantes na população com a finalidade de identificar a frequência dessas mutações no genoma dos RVA (Iturriza-Gómara *et al.*, 2001).

Os rearranjos são alterações na sequência do segmento genômico, algumas vezes na forma de deleção ou mais frequentemente como duplicação (Figura 8). A visualização deste tipo de mecanismo pela eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) caracteriza-se pela ausência de alguns segmentos da sua posição usual e/ou o aparecimento de bandas adicionais (Taniguchi & Urasawa, 1995).

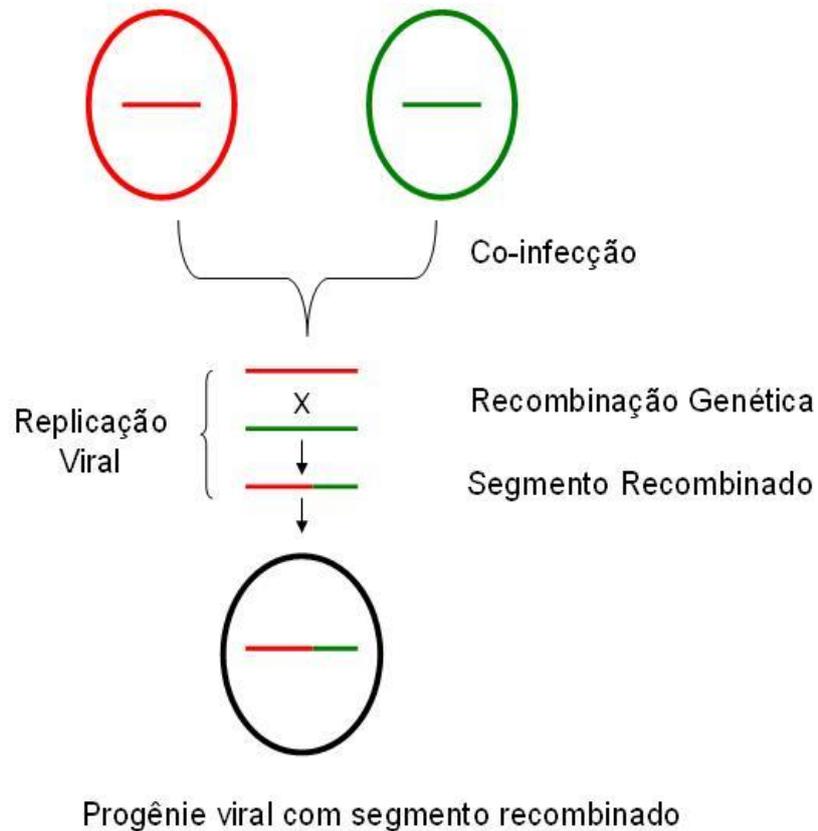


Figura 8. Esquema representativo de um evento de recombinação genética (adaptada de Gómez, 2009).

Os *reassortments* foram descritos pela primeira vez por Matsuno *et al.* (1980), que realizou co-infecção de cultura celular com RV bovino (Lincoln) e com RV símio (SA-11) e obtiveram o primeiro clone reestruturado. Por meio de comparações dos segmentos de RNAfd do clone com os parentais, observou-se que o genoma reestruturado apresentava os segmentos 4, 5, e 10 de SA-11 e segmentos 1, 2, 3, 6 e 11 de bovino, porém não foi possível determinar a origem dos outros segmentos. A presença de reestruturações *in natura* com especificidade animal parece mais frequente nos países em desenvolvimento, provavelmente facilitada pela precariedade das condições de saneamento básico e higiene, defesas imunológicas limitadas, desnutrição, além do estreito relacionamento entre o homem, animais domésticos e silvestres, proporcionando infecções mistas e, conseqüentemente, maior possibilidade de *reassortment* (Cook *et al.*, 2004).

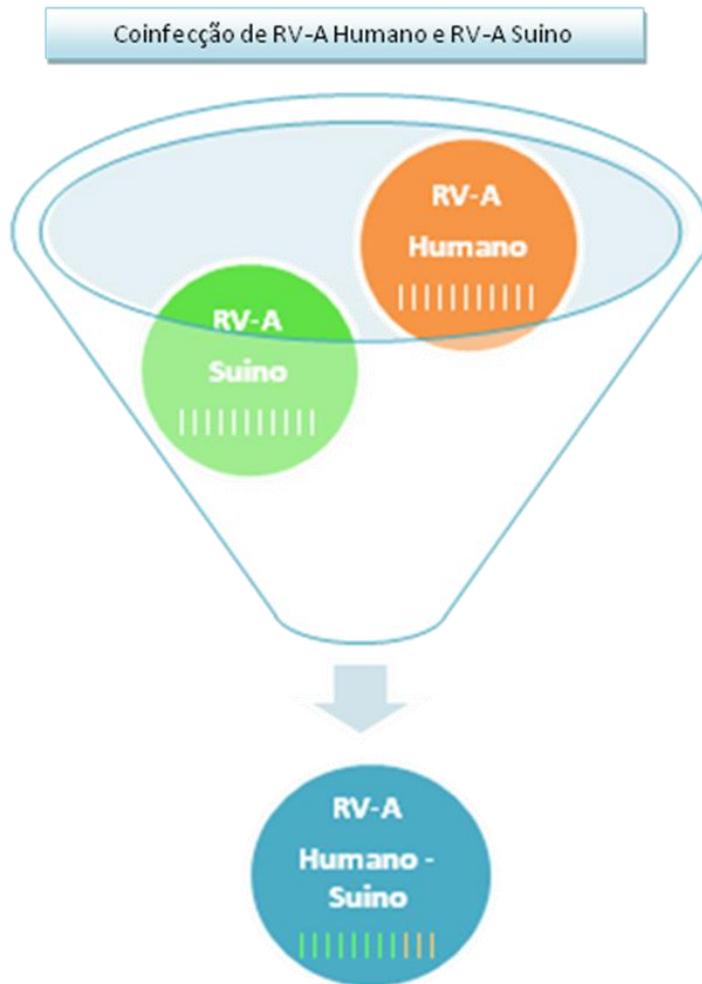


Figura 9. Esquema representativo de um evento de reassortment entre rotavírus da espécie A de origem humana e origem suína (adaptada de Gómez, 2009).

1.2.7 Epidemiologia dos rotavirus da espécie A

Teoricamente, toda criança, com idade de até cinco anos, já foi afetada por pelo menos um episódio de GA por RVA. Estima-se que esses sejam os responsáveis por 40% das hospitalizações infantis. Os países em desenvolvimento, principalmente Ásia e África, são os que apresentam maiores taxas de mortalidade por decorrência de GA por RVA (**Figura 10**) (WHO, 2009). Apesar do número limitado de óbitos nos países desenvolvidos, observa-se uma elevada taxa de morbidade (Parashar *et al.*, 2006).

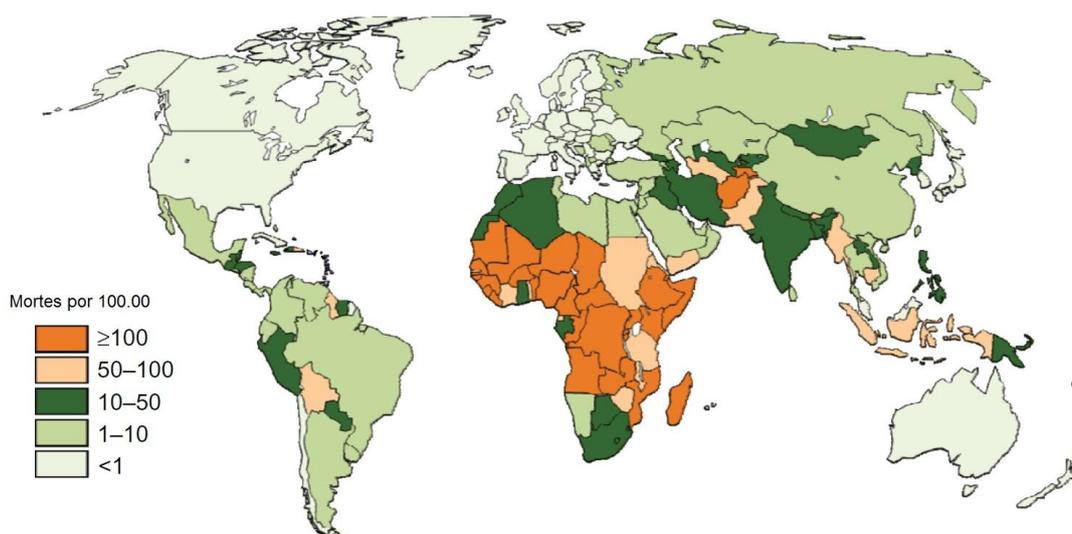


Figura 10. Estimativa da incidência de mortes por rotavírus da espécie A (adaptada de Chandran *et al.*, 2010).

1.2.7.1 Distribuição mundial dos genótipos de rotavirus da espécie A

A distribuição universal dos RVA apresenta ampla caracterização e descrição, graças ao esforço conjunto da comunidade científica internacional para aumentar a compreensão da história natural dessa infecção e da evolução da epidemiologia dos RVA, que gerou um volume substancial de informações epidemiológicas valiosas (Santos & Hoshino, 2005).

Neste contexto de vasta distribuição mundial dos RVA, o padrão de sazonalidade é melhor observado apenas nas regiões de clima temperado, com surtos e epidemias nos meses mais frios e secos do ano. Em geral, nas regiões de clima tropical as infecções por RVA ocorrem ao longo de todo o ano (Estes & Kapikian *et al.*, 2007).

Estudos epidemiológicos demonstraram que combinações distintas de genótipos P e G podem ser encontradas simultaneamente na mesma região e que, nessa área, o genótipo prevalente pode mudar anualmente. Outra informação relevante é a de que os genótipos prevalentes em diferentes regiões de um país podem variar no mesmo período epidêmico (Perez-Vargas *et al.*, 2006).

Os genótipos G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e, G9P[8] são responsáveis por 92% das infecções de RVA em humanos, sendo importantes alvos de estudos para o desenvolvimento de vacinas (Kirkwood, 2010). Contudo o genótipo G1P[8] é o mais prevalente mundialmente, sendo responsável por mais de 70% das infecções por RVA na América do Norte, Europa e Austrália, mas apenas 30% das infecções por RVA na América do Sul e Ásia, e 23% na África (Tate *et al.*, 2010).

Recentemente, outros genótipos de RVA estão sendo descritos e considerados como emergentes epidemiologicamente. Este é o caso de G5, em países da África e da Ásia; assim como G8, G10 e G12 mundialmente. Além disso, combinações atípicas em amostras humanas são detectadas em diversos países, sendo a maioria destas nos países da África, América Latina e Ásia (Matthijssens *et al.*, 2010; Iturriza-Gómara *et al.*, 2011).

1.2.7.2 Distribuição dos genótipos de rotavirus da espécie A no Brasil

Leite e colaboradores (2008) realizaram um estudo de revisão de artigos relatando a detecção de genótipos de RVA no Brasil no período compreendido entre 1982 e 2007. Dessa forma, propuseram a existência de três períodos epidemiológicos no Brasil: i) de 1982-1995, os genótipos G1 a G4 foram os mais prevalentes, com a circulação do genótipo G5 em aproximadamente 10% das amostras; ii) de 1996-2005, G9 emergiu, G5 teve a sua detecção reduzida e G2P[4] foi pouco detectado; iii) de 2006-2007, o genótipo G2P[4] reemergiu e tornou-se o genótipo predominante sendo detectado em 74% das amostras (**Figura 11**).

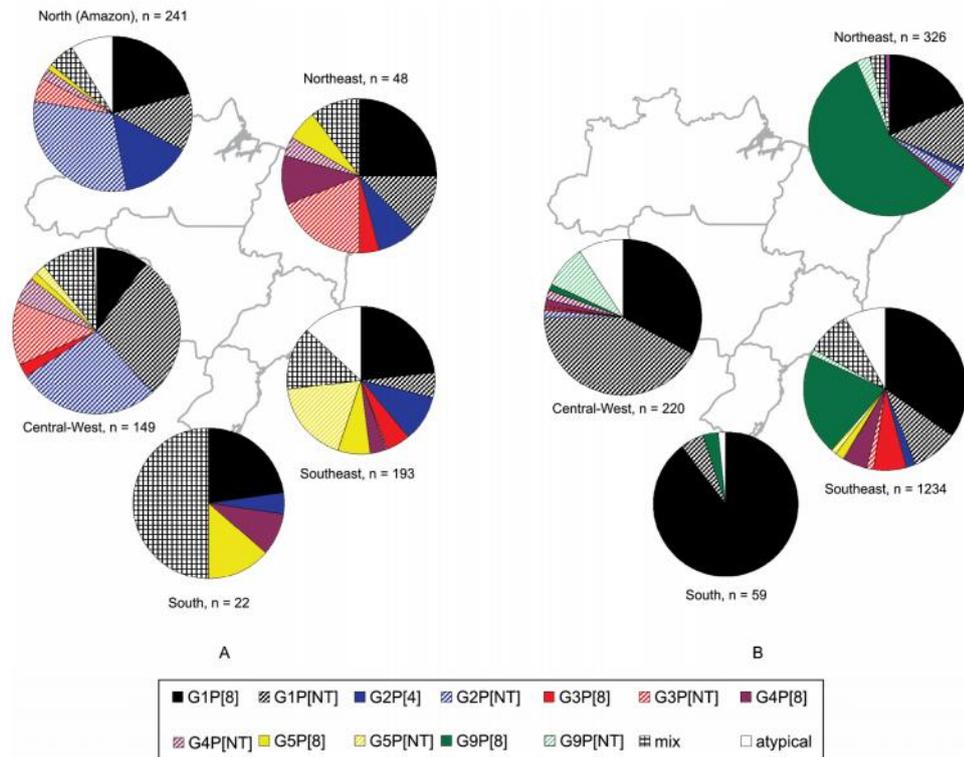


Figura 11. Distribuição dos genótipos de rotavírus da espécie A no Brasil, por região geográfica. A: de 1982 a 1995; B: de 1996 a 2005 (Leite *et al.* 2008).

Análises filogenéticas de amostras de RVA G9P[8] isoladas no estado do Acre, Norte do Brasil, entre 2005 e 2006, revelaram a presença de uma nova variante genotípica possivelmente em virtude de reestruturação gênica entre amostras humanas nos cinco genes analisados (Tort *et al.*, 2010). Por sua vez, uma análise comparativa de espécimes clínicos contendo RVA de genótipo G5 coletadas entre 1986 e 2005, e protótipos de RVA de diversos países disponíveis no *Genbank* apontou a existência de 3 linhagens de VP7 para este genótipo. Esta análise sugere a ocorrência de dois eventos de transmissão independentes de suínos para humanos (Silva *et al.*, 2011).

1.2.7.3 Re-emergência do genótipo G2P[4]

Um aumento significativo na ocorrência do genótipo G2P[4] foi verificado a partir de 2005, sendo este o mais prevalente seguido de G1, G3 e G9 (Leite *et al.*, 2008) (**Figura 12**). No período de 2006 a 2007, que corresponde ao primeiro ano de implementação da vacina monovalente G1P[8], Rotarix[®], G2 de RVA foi detectado nos estados do Rio de Janeiro, Sergipe, Pernambuco, Piauí e Minas Gerais (Leite *et al.*, 2008). No Nordeste

do Brasil, diferentes estudos mostraram uma prevalência de 100% para o genótipo G2P[4] no ano de 2007 (Gurgel *et al.*, 2007, Nakagomi *et al.*, 2008a). Há relatos de estados do Norte do Brasil que demonstram que a re-emergência de G2 alcançou taxas de até 90% (de Oliveira *et al.*, 2008).

A re-emergência do genótipo G2P[4] de RVA nestes últimos anos parece estar refletindo um fenômeno continental. Tem sido reportado um aumento na prevalência deste genótipo em diferentes países: Honduras (Ferrera *et al.*, 2007), Argentina, Paraguai (Amarilla *et al.*, 2007), El Salvador e Guatemala (Patel *et al.*, 2008). Porém, deve ser ressaltado que quando estes estudos foram realizados, tais países ainda não tinham introduzido uma vacina contra o RVA em suas campanhas de vacinação em massa.

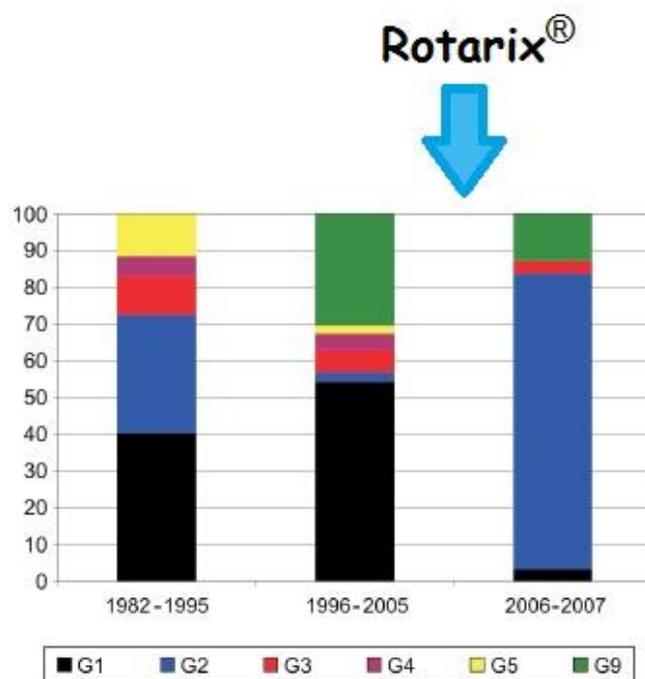


Figura 12. Taxa de detecção dos diferentes genótipos G de rotavírus A no Brasil em diferentes períodos (Adaptada de Leite *et al.* 2008)

Em Bangladesh, foi reportada taxa de detecção de G2P[4] de 43% no período de 2005 a 2006 (Rahman *et al.*, 2007). Num estudo realizado em Salento, Itália, G2 foi detectado em 45% no período de 2006 a 2007 (de Donno *et al.*, 2009). Em Portugal, um estudo mostrou uma taxa de detecção de 70% do genótipo G2P[4] no ano de 2007 (Antunes *et al.*, 2009).

Em um estudo realizado na Austrália, Bishop e colaboradores (1991) observaram que o evento de re-emergência do genótipo G2 apresenta um ciclo de 10 anos (Bishop *et al.*, 1991). Esses dados foram corroborados, parcialmente, por Leite e colaboradores (2008), que observaram intervalo de 10 anos entre a diminuição da detecção deste genótipo, em 1996, e a sua re-emergência em 2005.

Recentemente, Carvalho-Costa e colaboradores (2011) descreveram a distribuição dos genótipos de RVA em diversas regiões geográficas do Brasil, no período de 2005 a 2009, confirmando a circulação dos genótipos G1P[8], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] e um importante aumento na detecção do genótipo G2P[4] entre 2006 e 2008 (**Figura 13**). Entretanto, no ano de 2009, este genótipo sofreu redução significativa na detecção. Este trabalho destaca que o fenômeno da reemergência de G2P[4] pode estar associado à pressão de seleção da vacina, baixa proteção heteróloga desta e/ou variação temporal natural da distribuição de G2P[4]. O mesmo fenômeno também foi descrito em países da América Latina como Paraguai, Honduras, Guatemala, El Salvador, Peru e Bolívia, sugerindo que este pode ser um fenômeno continental. Além disso, o estudo sugere que a re-emergência pode estar relacionada a outros fatores que não a implementação de Rotarix®, já que estes e outros países vivenciando o mesmo fenômeno não tinham introduziram esta vacina até o momento do início do pico da detecção.

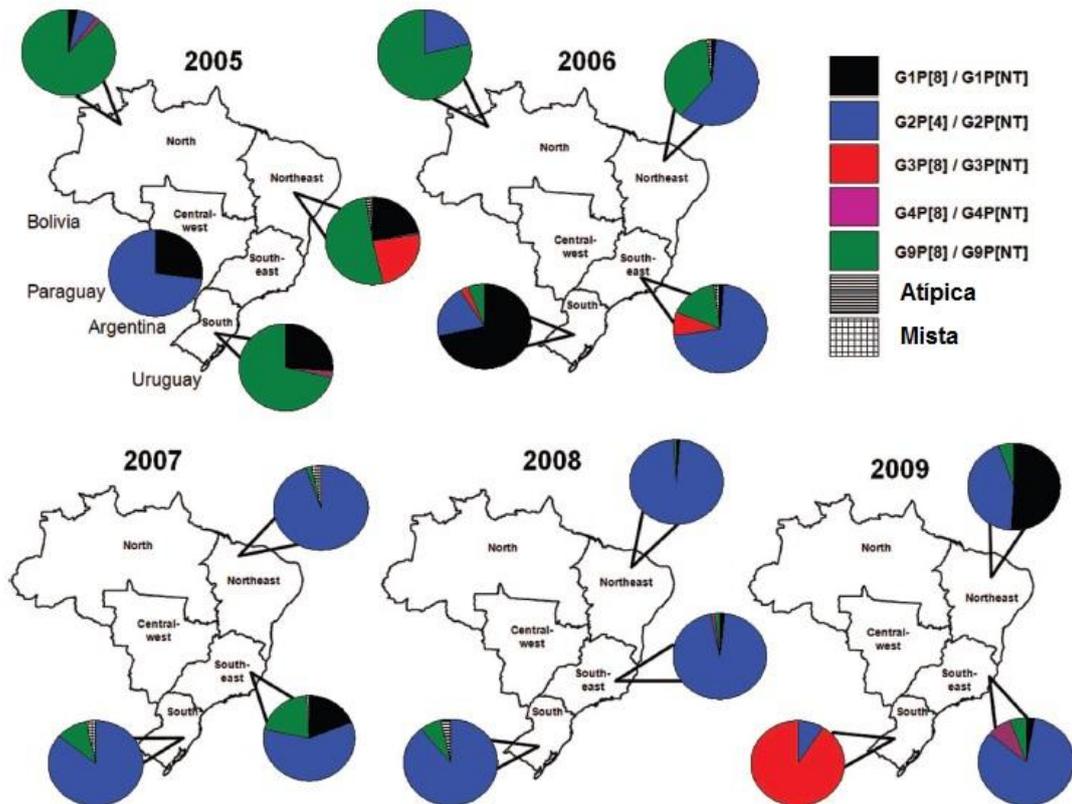


Figura 13. Distribuição dos genótipos de rotavírus da espécie A no Brasil entre 2005 e 2009 (Adaptada de Carcalho-Costa *et al.*, 2011).

1.2.7.4 Prevenção e controle dos rotavírus da espécie A

Diferentes estudos demonstraram que somente as melhorias das condições sanitárias, bem como a destinação adequada de dejetos de humanos e de animais, não são suficientes para o controle e a profilaxia das infecções por RVA, visto que a morbidade é semelhante nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (Anderson, 2010).

A infecção natural não confere proteção completa contra reinfecção e a prevenção da GA durante os dois primeiros anos de vida é fundamental, pois é neste período que a mesma é mais grave. Assim, o desenvolvimento e a implementação de uma vacina segura e eficaz representa uma boa estratégia para diminuir as formas mais graves da doença (Anderson, 2010).

Duas vacinas contra RVA encontram-se disponíveis no Brasil e em diversos países: i) RotaTeq[®] (Merck, North Wales, PE, EUA); ii) Rotarix[®] (GlaxoSmithKline [GSK], Rixensart, Bélgica). A Rotateq[®] é uma vacina oral, pentavalente (G1, G2, G3, G4 e P[8]) de vírus reestruturado (WC3 - bovino) (Vesikari *et al.*, 2006). A vacina Rotarix[®] é monovalente (G1P[8]), atenuada, e de origem humana (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006). As duas vacinas mostram-se protetoras contra os 5 genótipos mais comuns de RVA que circulam mundialmente e o impacto positivo da introdução destas vacinas já foi demonstrado em alguns países europeus, africanos e americanos, inclusive o Brasil (Chandran *et al.*, 2010; de Oliveira *et al.*, 2011; WHO, 2011)

Desde 2006, 14 países introduziram uma vacina contra RVA em seus PNI, sendo a Rotarix[®]: no Brasil (primeiro país em âmbito de campanha nacional, em março de 2006), El Salvador (2006), Panamá (2006), México (2006), Venezuela (2006), Equador (2007), Honduras (2009), Peru (2009), Bolívia (2008), Colômbia (2009), Paraguai (2010) e Guatemala (2009); e a Rotateq[®]: na Nicarágua (2006), Guiana (2010) e Ilhas Cayman (2009) (WHO, 2011).

Para tratamento das infecções por RVA, não existem medicamentos eficazes para a terapia antiviral disponíveis comercialmente. Recentemente, foi demonstrado que a Nitazoxanida (NTZ), licenciada nos Estados Unidos para tratamento da GA causada por *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia*, reduz os sintomas clínicos associados a GA por infecção de RVA. O mecanismo de ação está associado à inibição da replicação, possivelmente, no nível pós-transcricional, impedindo a glicosilação de VP7 e a interação de NSP5 e NSP2, inibindo a formação do viroplasma (Rossignol *et al.*, 2006)

1.3 Norovírus

1.3.1 Histórico

A expressão “winter vomiting disease” (que em português significa doença do vômito contraída no inverno) foi introduzida por Zahorsky (1929), significando uma doença altamente infecciosa cujas características clínicas predominantes eram vômito, dores abdominais e diarreia. Provavelmente, esse foi o primeiro relato de infecção por NoV. Posteriormente, surtos com características semelhantes foram descritos (Reimann *et al.*, 1945 a, b; Clarke *et al.*, 1972).

Em 1968, um surto de “winter vomiting disease” ocorreu entre estudantes e professores de uma escola elementar em Norwalk, Ohio, nos Estados Unidos (Adler e Zickl, 1969). Nesta ocasião, métodos de diagnóstico não evidenciaram o agente etiológico. Entretanto, na década de 70, Kapikian e colaboradores (1972) identificaram agregados de partículas “vírus-like” por imunomicroscopia eletrônica (IME) e denominaram-nos de vírus Norwalk. Posteriormente, o diagnóstico de quadros de GA por ME resultou em descrições dos “Norwalk-like virus” (NLV) como agente destas infecções, em virtude da morfologia e do tamanho da partícula viral, entre 20 e 40nm.

Inicialmente, os NLVs foram descritos como pertencentes à família *Picornaviridae*, considerando a aparência do vírion à IME (Caul & Appleton, 1987; Appleton, 1987). Greenberg e colaboradores (1981) evidenciaram uma proteína estrutural de NLV com tamanho aproximado de 59kDa e, por isso propuseram que estes constituíssem um novo gênero da família *Caliciviridae*, cujas características comuns são a presença de uma proteína estrutural principal, que dá origem ao capsídeo; simetria icosaédrica e apresentação de 32 capsômeros formando a imagem de um de cálice (*calix*, em latim) (Green *et al.*, 2000).

Por muitos anos, a falta de um sistema de cultura de células para a propagação destes vírus impediu o diagnóstico de infecções por calicivírus

humanos (HuCV) em casos de GA e por esse motivo, estes agentes obtinham importância epidemiológica inferior por limitações técnicas. Entretanto, a partir da década de 90, a utilização de métodos moleculares permitiu evidenciar o impacto destes vírus nos surtos de GA (Glass *et al.*, 2000).

1.3.2 Classificação

A família *Caliciviridae* é constituída por cinco gêneros: *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Sapovirus*, *Norovirus* e *Nebovirus* (Clarke *et al.*, 2011). O gênero *Norovirus* apresenta cinco genogrupos (G): GI, GII, GIII, GIV e GV, baseado na análise da sequência de aminoácidos que codifica a proteína VP1 do capsídeo. Os norovírus (NoV) identificados em humanos são classificados filogeneticamente como pertencentes aos GI, GII e GIV. Porém, pertencente a estes genogrupos também foram descritos NoV que infectam suínos, classificados como GII/11, GII/18 e GII/19 (Zheng *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005). (**Figura 14**).

Os G são divididos em genótipos (GG), que representam a unidade mínima de classificação dos NoV. Genótipos são definidos por similaridade de aminoácidos codificantes da proteína VP1, em um determinado ramo da árvore filogenética. Como regra geral, considera-se que as amostras que compartilham >85% de similaridade de aminoácidos encontram-se dentro do mesmo genótipo (*cluster* genético). Entretanto, amostras de diferentes genótipos no mesmo genogrupo compartilham entre 55% e 85% de similaridade (Zheng *et al.*, 2006). Com base nesses critérios, foram identificados pelo menos 35 genótipos de NoV (CDC, 2011a) (**Figura 14**).

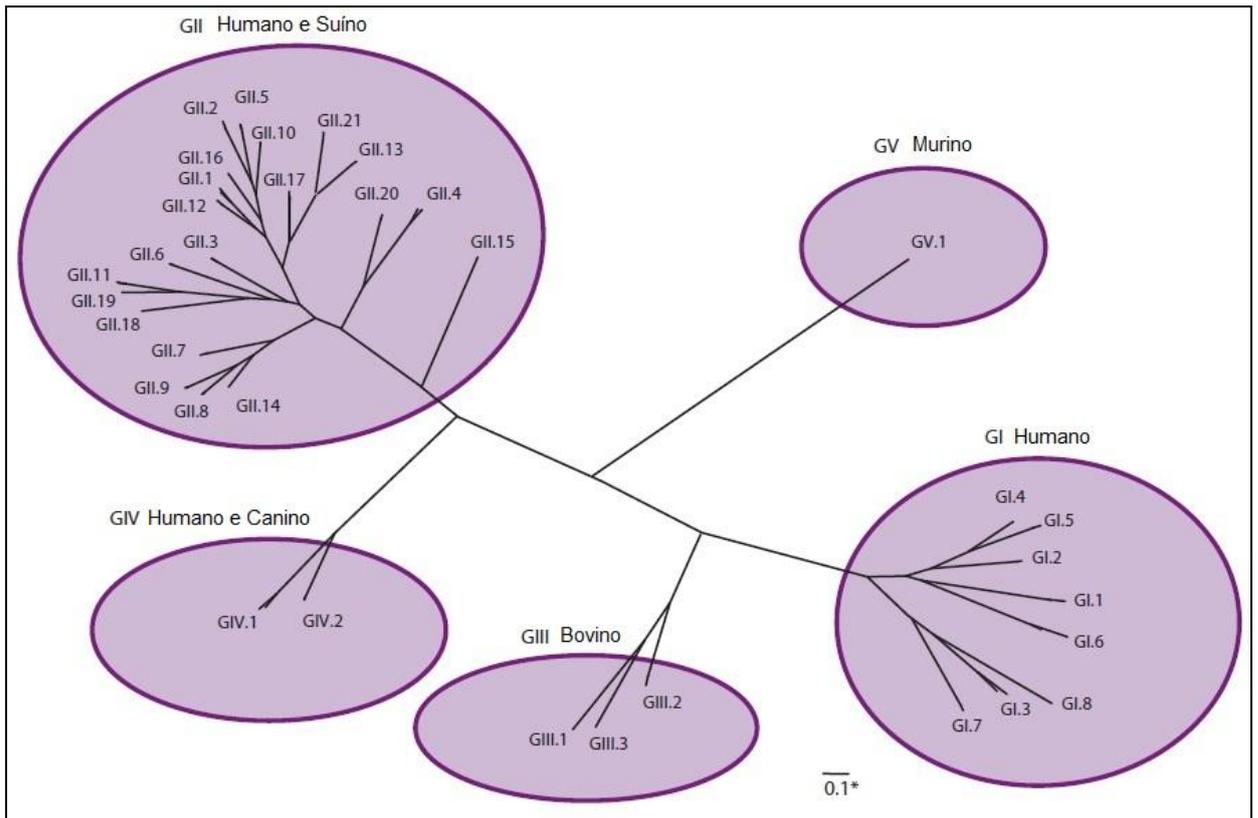


Figura 14. Classificação dos norovírus. Com base na variabilidade genética da sequência completa do gene que codifica a VP1, os norovírus são classificados em 5 genogrupos (GI a GV) (Adaptada de CDC,2011a).

1.3.3 Partícula viral

Quando submetida à ME, a partícula viral dos NoV apresenta morfologia esférica, com simetria icosaédrica, 27 nm de diâmetro, número de triangulação (T) igual a três, com 32 depressões grandes na superfície do capsídeo. (Prasad *et al.*, 1999) (**Figura 15**).

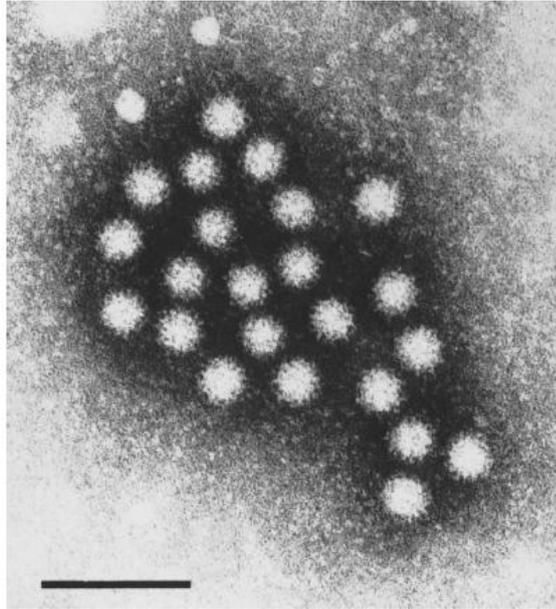


Figura 15. Micrografia eletrônica de partículas de norovírus em suspensão fecal. (Adaptada de Fankhauser *et al.*, 2002.)

Os NoV são não envelopados e contém genoma de RNA simples fita (RNAsf), com polaridade positiva, isolado do meio externo pelo capsídeo. Os 90 capsômeros são constituídos por dímeros da proteína capsídica VP1. Esta proteína apresenta dois domínios principais (S e P), com localizações interna e externa, respectivamente. Os domínios S e P estão unidos por uma estrutura protéica com aspecto de dobradiça. O domínio P está subdividido em dois subdomínios, P1, interno, e P2, externo. A região hipervariável no domínio P2 tem um papel importante no reconhecimento de receptores celulares e proporciona a imunogenicidade do vírion (Prasad *et al.*, 1999; Hardy, 2005) **(Figura 16)**.

180 Moléculas (90 dímeros) de VP1

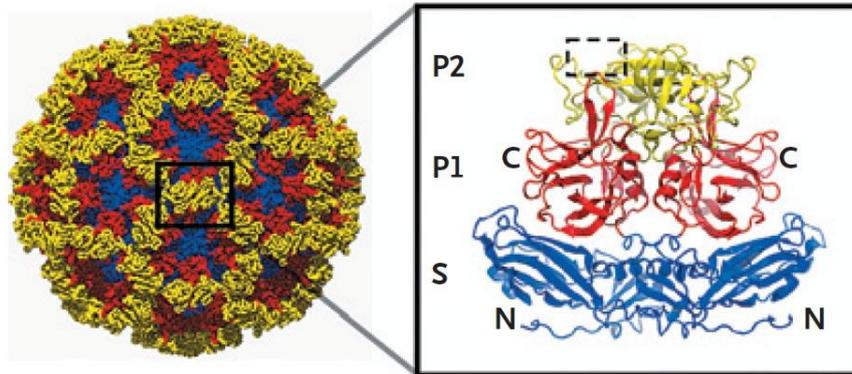


Figura 16. Estrutura do capsídeo e da proteína capsídica VP1 dos norovírus (Adaptada de Glass *et al.*, 2009). O domínio S e os subdomínios P1 e 2 estão representados em azul, vermelho e amarelo, respectivamente.

Os NoV humanos possuem densidade de 1,33 a 1,41g/cm³ em cloreto de cério (CsCl). Experimentos em voluntários mostraram que as partículas continuam infecciosas mesmo após: a) exposição do filtrado fecal ao pH 2,7 por 3 horas em temperatura ambiente; b) tratamento com éter 20%, à 40°C por 18 horas; c) incubação à 60°C por 30 minutos (Dolin *et al.*, 1972).

As partículas virais são resistentes à inativação pelo tratamento com cloro na concentração de 3,75 a 6,25mg/L (cloro residual livre de 0,5 a 1,0mg/L), usualmente encontrada na água distribuída pelo sistema de abastecimento. A inativação só é alcançada após tratamento com cloro a 10mg/L. Este fato sugere que a partícula viral dos NoV é mais resistente que a dos poliovírus tipo 1, dos RVA e do bacteriófago F2 (Keswick *et al* 1985; Green, 2007).

1.3.4 Genoma e proteínas virais

O genoma dos NoV possui três fases abertas de leitura (ORF), uma região não traduzida (UTR), tanto na extremidade 3' quanto na 5', e uma cauda de poliadenilação (A) na extremidade 3'. Além disso, apresentam RNA subgenômico, com aproximadamente 2.300 nucleotídeos,

que contém as ORF 2 e 3, e UTR na extremidade 3' (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2003) (**Figura 17**).

A ORF1, de aproximadamente 5.000 nucleotídeos, codifica uma poliproteína não estrutural de 200kDa que é processada, proteoliticamente, originando as proteínas p48, nucleosídeo trifosfatase (NTPase), p22, VPg, protease (PRO) e RNA polimerase dependente RNA (RpdR). As ORF 2 e 3, localizadas no extremo 3' do genoma codificam para as proteínas do capsídeo denominadas de VP1 e VP2. No extremo 5' do RNA genômico e sub-genômico encontra-se a proteína VPg ligada covalentemente. Esta proteína, de 15 kDa atua, possivelmente, na síntese de novas moléculas de RNA viral (Hardy, 2005) (**Figura 17**).

A RpdR é codificada pela região aminoacídica localizada do aa 1.281 até a extremidade carboxi terminal da ORF1 e apresenta domínios estruturais e catalíticos característicos das RpdR de outros vírus de RNA de polaridade positiva (Hardy, 2005).

A região codificadora da proteína VP1 encontra-se entre os aa 530 e 555. Esta proteína apresenta dois domínios conservados que flanqueiam um domínio variável central, com propriedades antigênicas que definem a especificidade da amostra. Os 225 aa da extremidade N-terminal da região codificadora de VP1 geram o domínio S, que é um dos elementos fundamentais para a constituição do capsídeo icosaédrico. Por outro lado, a extremidade C-terminal (aa de 225 a 530) é responsável pela codificação do domínio P (Hardy, 2005) (**Figura 17**).

O gene que codifica para a proteína VP2 é constituído por 268 aa apresentando alta variabilidade genética na sequência nucleotídica, quando comparado com diferentes estirpes virais. No virion, a VP2 está presente em uma ou duas cópias, sendo essencial na síntese das partículas infecciosas (Hardy 2005). A região da proteína localizada entre os aa 108 e 152 contém o domínio de interação com a proteína VP1. A proteína VP2 promove a encapsidação do RNA genômico e a estabilização dos dímeros da proteína VP1 para produzir partículas resistentes à degradação proteolítica (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2003).

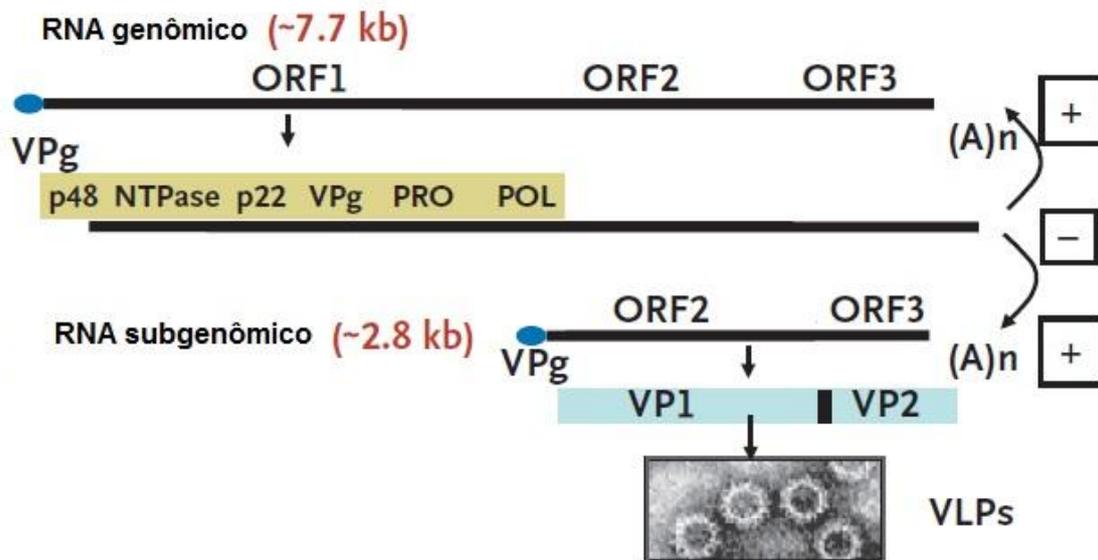


Figura 17. Organização do genoma dos norovírus. (Adaptada de Glass *et al.*, 2009).

1.3.5 Biossíntese viral

O ciclo replicativo dos NoV ainda não foi totalmente elucidado. Até o momento, sabe-se que estes apresentam estratégia similar a outros vírus com genoma de RNA de polaridade positiva e que a entrada do vírus na célula é diretamente dependente do suprimento de colesterol do hospedeiro e da presença da GTPase Dynamin II no processo de endocitose dos NoV (Perry & Wobus, 2010). Após a interação da partícula viral com a célula hospedeira, ocorre, provavelmente, endocitose do vírus como forma de entrada na célula e, subsequentemente, liberação do RNA viral no citoplasma celular. O início da tradução da fita positiva do genoma é mediado por interações da proteína VPg, ligada ao RNA genômico, com mecanismos de tradução celular (Goodfellow *et al.*, 2005; Guix *et al.*, 2007).

A ORF1 é inicialmente traduzida para produção de uma poliproteína não estrutural que, posteriormente, é processada pela proteinase viral, gerando as proteínas não estruturais. A síntese da fita negativa de RNA, a partir do molde do RNA genômico positivo, se inicia na extremidade 3' da fita molde positiva e envolve interações com proteínas virais. A fita negativa serve

como molde para a transcrição de novas fitas de RNA genômico e subgenômico. A grande quantidade de RNA subgenômico positivo viral serve como fita molde para a tradução das proteínas estruturais VP1 e VP2. A replicação do RNA viral está associada a membranas celulares do hospedeiro (Green, 2007). Os mecanismos de empacotamento do RNA, a maturação e a liberação das partículas virais ainda não estão totalmente elucidados (Perry & Wobus, 2010).

Os antígenos de histocompatibilidade - *Histo-Blood Group Antigens* (HBGA) – são um alvo importante de pesquisas, que demonstram a sua funcionalidade como receptores e co-receptores, proporcionando a infecção por NoV (Hutson *et al* 2002; Rockx *et al* 2005; Shanker *et al.*, 2011). Há associação direta entre a expressão polimórfica dos HBGAs e a susceptibilidade humana à infecção por NoV. Várias enzimas demonstram ser importantes na síntese dos HBGAs, principalmente a fucosil transferase 2 (FUT-2). Mutações no gene que as codifica gera uma enzima não funcional e, conseqüentemente, expressão polimórfica afetada dos HBGAs. Em indivíduos portadores de tais mutações, a infecção por NoV mostra-se ineficiente, proporcionando resistência a essa pessoa (Thorven *et al* 2005; Carlsson *et al* 2009).

1.3.6 Diagnóstico laboratorial

A IME utilizada na detecção das primeiras partículas de NoV é um método de baixa sensibilidade (10^6 partículas virais/grama de fezes). Por esse motivo, não é aplicável à rotina de diagnóstico ou à pesquisa epidemiológica. (CDC, 2011a).

Após a caracterização molecular do genoma dos NoV, foi possível a expressão da proteína VP1 no sistema de expressão utilizando baculovírus como vetor, gerando “vírus-like particles” (VLPs) constituídas por um capsídeo morfológica e antigenicamente similar às partículas virais, com ausência do genoma viral (Jiang *et al.*, 1992; Leite *et al.*, 1996b). A utilização de VLPs permitiu a imunização de animais e obtenção de anticorpos para o

desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos (EIE). Este método dispõe da vantagem de evitar a reatividade cruzada com outros vírus entéricos e eventuais resultados falso positivos. Entretanto, a utilização desta técnica é limitada em virtude da ampla diversidade antigênica dos NoV, diminuindo a confiabilidade dos dados (Constantini *et al.*, 2010).

A técnica de maior importância na detecção dos NoV em espécimes clínicos derivadas de casos esporádicos ou epidêmicos é a PCR precedida pela transcrição reversa (RT-PCR). Se comparada nos quesitos sensibilidade e especificidade com diversas técnicas de detecção dos NoV, a RT-PCR mostra-se como padrão-ouro. Os EIE podem ser empregados na triagem de surtos de gastroenterite aguda. Porém, a detecção deve ser complementada com a RT-PCR para a análise das amostras negativas pelo EIE (de Bruin *et al.*, 2006; Castriciano *et al.*, 2007).

Diferentes regiões do genoma viral são alvo para o desenho dos iniciadores para a amplificação genômica, sendo a região da RpdR a mais freqüentemente utilizada por ser uma região bem conservada dentre as diferentes estirpes de NoV (Beuret *et al.*, 2002; Boxman *et al.*, 2006; La Rosa *et al.*, 2007). Neste gene, os pares de iniciadores mais utilizados flanqueiam as regiões denominadas A e B. As regiões denominadas C e D estão localizadas no gene VP1, que codifica para a proteína principal do capsídeo e permitem a genotipagem da estirpe analisada através do sequenciamento do amplicon obtido na reação de RT-PCR (**Figura 18**) (Kojima *et al.*, 2002; Vinjé *et al.*, 2004).

Recentemente, foi desenvolvida uma qRT-PCR “monoplex” para quantificar os GI e GII que utiliza iniciadores direcionados à região mais conservada do genoma viral, localizada na junção das ORFs 1 e 2 (**Figura 18**). Este ensaio é mais sensível que as RT-PCR qualitativas que utilizam iniciadores direcionados para a RpdR, capaz de detectar até 20.000 cópias de RNA viral por grama de fezes (Kageyama *et al.*, 2003). Em seguida, esses iniciadores foram adaptados para um ensaio “multiplex” propiciando a detecção e a quantificação simultânea dos NV GI e GII, apresentando

sensibilidade e especificidade disponíveis no ensaio “monoplex”, economizando tempo e custo (Pang *et al.*, 2005).

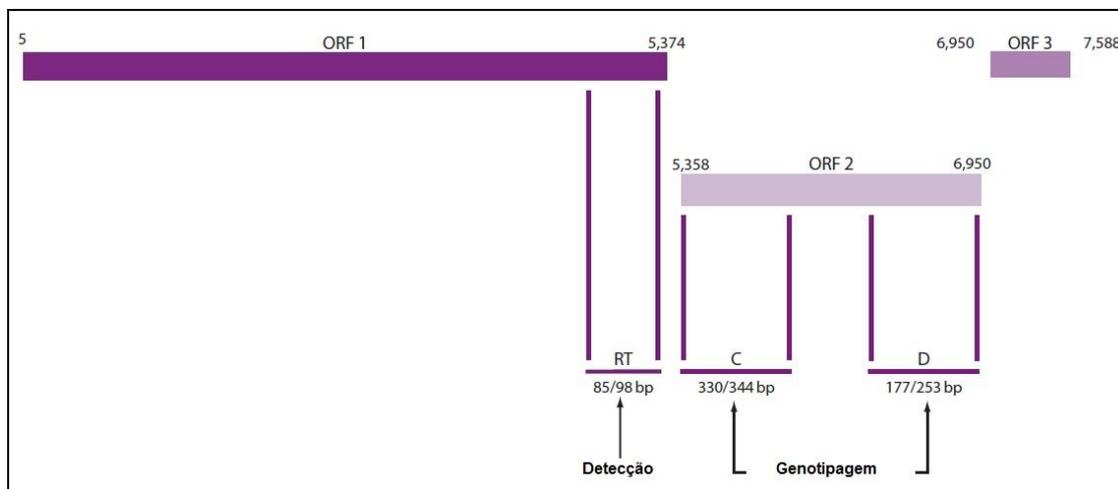


Figura 18 Esquema representativo das regiões alvo nos ensaios de PCR convencional e em tempo real para detecção e genotipagem dos norovírus (Adaptada de CDC, 2011a).

1.3.7 Epidemiologia

O modo de transmissão dos NoV é predominantemente por via oral, pela ingestão de água e alimentos contaminados, pelo contato pessoa a pessoa, ou mesmo por aerossóis produzidos durante o vômito (Marks *et al.*, 2000; Pang *et al.*, 2000; Moreno- Espinosa *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2007). Além disso, este é um vírus de alta infecciosidade, apresentando dose infectante de 10 a 100 partículas e há a probabilidade de 50% de desenvolver uma infecção quando apenas uma partícula viral é ingerida (Teunis *et al.*, 2008). Pessoas infectadas podem eliminar os vírus nas fezes após o período sintomático por mais de 20 dias, sendo assim uma fonte de contaminação para potenciais novos casos de GA (Rockx *et al.*, 2002). Por estas características, os NoV causam surtos de GA principalmente em ambientes confinados e de uso coletivo como hospitais, clínicas geriátricas, escolas, cruzeiros e restaurantes, afetando indivíduos de todos os grupos etários (Rockx *et al.*, 2002; Widdowson *et al.*, 2005).

Diferentes tipos de alimentos são apontados como fonte de surtos de GA causados por NoV. Os bivalves, especialmente as ostras, são os principais alimentos envolvidos em tais surtos devido ao consumo cru destes organismos filtradores; porém, saladas e sanduíches também têm sido associados (Daniels *et al.*, 2000; Boxman *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2007). Uma via frequente de contaminação de alimentos é pela manipulação destes por indivíduos infectados que não realizam uma adequada higiene (Widdowson *et al.*, 2005).

Nos Estados Unidos, o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) estimou a existência de aproximadamente 23 milhões de infecções por NoV por ano, principalmente entre idosos e pessoas de maior idade, com ocorrência de surtos em casas de retiro (Jiang *et al.*, 1996; CDC, 2003; 2011a; Ike *et al.*, 2006).

O padrão de sazonalidade para as infecções por NoV não está bem estabelecido, pois há ocorrência de casos de GA causadas por NoV durante todo o ano. Contudo, nos países de clima temperado, picos de detecção são identificados frequentemente no período do inverno (CDC, 2011a).

Atualmente, pela utilização das técnicas de biologia molecular, os NoV são apontados como responsáveis por mais de 90% dos surtos de GA no mundo, sendo associados a 1,1 milhão de hospitalizações e 218.000 mortes em crianças de países em desenvolvimento (Patel *et al.*, 2008; Scallan *et al.*, 2011).

Estudos de caracterização molecular dos NoV nos casos de GA revelam uma frequente co-circulação de diferentes genótipos dos GI e GII. Entretanto, o genótipo GII.4 é o mais prevalente, contabilizando por 75% a 100% das estirpes caracterizadas. Devido à rápida evolução destes vírus, novas variantes surgem com frequência substituindo as variantes antigas e se disseminando em diferentes regiões do mundo rapidamente. Este fenômeno foi evidenciado particularmente com as variantes GII.4. O surgimento de novas variantes está relacionado com um considerável aumento no número de surtos reportados (Kroneman *et al.*, 2006; Fioretti *et al.*, 2011).

Na América do sul, os NoVs foram descritos no Chile, na Argentina, no Peru, no Paraguai e no Brasil relacionados a surtos e casos esporádicos de gastroenterite aguda. Nestes países, estudos de caracterização molecular e de monitoramento de amostras clínicas e ambientais demonstraram a importância epidemiológica do vírus (Parashar *et al.*, 2004; Vidal *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2007; Andreasi *et al.*, 2008; Fioretti *et al.*, 2011 e Dinatale *et al.*, 2011).

No Brasil, os NoV foram descritos pela primeira vez em crianças provenientes de favelas em Fortaleza, Ceará (Parks *et al.*, 1999). No Rio de Janeiro, São Paulo, Recife e Espírito Santo foram detectados e caracterizados molecularmente os NoVs coletados de crianças com GA hospitalizadas (Castilho *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2007; Victoria *et al.*, 2007; Nakagomi *et al.*, 2008b; Ribeiro *et al.*, 2008), sintomáticas ou assintomáticas (Barreira *et al.* 2010) e em surtos de GA acontecidos em creches e comunidades (Gallimore *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2008; 2010).

A ocorrência destas infecções têm relatos de altas taxas de detecção chegando a valores de 40%, como evidenciado no trabalho realizado na cidade de Vitória, Espírito Santo (Ribeiro *et al.*, 2008). Diferentes genótipos dos GI e GII têm sido detectados sendo o GII.4 o mais prevalente, acompanhando a tendência mundial de ampla distribuição deste genótipo (Victoria *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2008; Barreira *et al.*, 2010).

1.3.8 Prevenção e controle

A prevenção dos surtos de GA causados pelos NoV está baseada na identificação imediata do modo de transmissão e na interrupção da dispersão, pelo controle da contaminação dos alimentos ou das fontes de água potável, pela higiene rigorosa dos profissionais que manipulam alimentos e das superfícies contaminadas, e pela redução da propagação secundária das

infecções por disseminação de pessoa a pessoa (Barker *et al.*, 2004; Gallimore *et al.* 2006; Podewils *et al.*, 2007; Fumian *et al.*, 2009).

Em ambientes de cuidados com a saúde, a prevenção das infecções nosocomiais envolve procedimentos de limpeza contínua. É fundamental a atenção na higiene das mãos após o contato com o paciente ou com objetos que podem estar contaminados (Wilhelmi *et al.*, 2003). O uso de detergentes é pouco efetivo na eliminação da contaminação destes vírus, sendo necessária a utilização de uma solução de hipoclorito (ClO^-) para a descontaminação de superfícies (Barker *et al.*, 2004). O vapor de álcool não inflamável em sistemas de CO_2 é utilizado nesses ambientes onde o vapor de cloro e outros compostos cáusticos poderiam danificar equipamentos médicos (Parashar *et al.*, 2001).

Os primeiros avanços para o desenvolvimento de uma vacina anti-NoV foram alcançados pela imunização de camundongos e de voluntários infectados pelo vírus. As formulações orais de VLP expressas em plantas transgênicas produziram resposta humoral nos indivíduos desafiados (Tacket 2005; LoBue *et al.*, 2006). Recentemente, El-Kamary e colaboradores (2010) reportaram dados clínicos de testes em Fase II, avaliando a resposta imune a uma vacina monovalente de VLP do vírus Norwalk administrada junto com MPL e quitosana como adjuvantes, por via intranasal. Os experimentos demonstraram uma alta segurança e eficiência da vacina na resposta imune sistêmica e de mucosa.

2. JUSTIFICATIVA

Estimam-se 114 milhões de casos anuais de GA por RVA no mundo, principalmente em crianças com idade menor ou igual a cinco anos; média de dois milhões de hospitalizações e 400 mil óbitos (Chandran *et al.*, 2010).

Os NoV são reconhecidos mundialmente como importantes agentes etiológicos de surtos de GA, que ocorrem principalmente como resultado da contaminação de alimentos e água. Atualmente, acredita-se que os NoV são responsáveis por 90% dos surtos de GA virais no mundo, e responsáveis por um milhão de hospitalizações e 218.000 mortes em crianças de países em desenvolvimento (Patel *et al.*, 2008).

Em virtude da complexidade da epidemiologia dos RVA, particularmente em países em desenvolvimento, o conhecimento dos genótipos das amostras circulantes é de fundamental importância, especialmente após a implementação da vacina monovalente Rotarix[®] (G1P[8]) pelo PNI no Brasil.

Dentre as regiões do Brasil, o Nordeste apresenta piores indicadores de saúde e socioeconômicos. Segundo dados do Ministério da Saúde (2010), a taxa de mortalidade por GA, em crianças com idade menor ou igual a cinco anos, apresenta significativa variação entre regiões, sendo consideravelmente maior no Nordeste brasileiro (do Carmo *et al.*, 2011).

Em Fortaleza, Ceará, os dados epidemiológicos de GA associada a infecções por bactérias e protozoários estão bem documentados (Coutinho *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2010; Quetz *et al.*, 2012). Até o momento, há poucos artigos científicos que reportem o panorama de detecção e de genotipagem de RVA e NoV em crianças menores que cinco anos na região Nordeste, sendo que apenas um destes (Parks *et al.*, 1999) aborda o Estado do Ceará.

Dessa forma, estudos de caracterização do perfil epidemiológico das infecções por RVA e NoV no Estado do Ceará são fundamentais para ampliar o entendimento da distribuição desses vírus na região Nordeste. Este estudo

está contribuindo para conhecer melhor o papel dos RVA e NoV na prevalência da GA em Fortaleza, Ceará.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar o perfil genotípico e analisar filogeneticamente os RVA e NoV detectados em amostras fecais de crianças, com idade menor que dez anos de idade, atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin, em Fortaleza, Ceará.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar RVA e NoV em espécimes clínicos de casos de GA.
- Avaliar a prevalência de RVA e NoV em Fortaleza, Ceará no período de abril de 2008 a maio de 2009.
- Determinar os genótipos dos RVA e NoV circulantes em Fortaleza, CE.
- Analisar a ocorrência de possíveis eventos de variabilidade genética dos genes de RVA que codificam para as proteínas VP4, VP7 e NSP4.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Espécimes clínicos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin em 08.04.08, sob o registro nº 022/08.

Foram obtidas 200 amostras de fezes de crianças, com diarreia e até dez anos de idade, atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin por apresentarem GA, na cidade de Fortaleza, Ceará. A coleta das amostras foi realizada no período entre maio de 2008 e abril de 2009.

4.2 Suspensão fecal

Foram preparadas suspensões fecais a 10% em tampão Tris-HCl Ca^{2+} 0,01M pH 7,2 em cabine de segurança biológica NB2, Holten Lamin Air MS 2010 Modelo 0.9. As suspensões foram homogeneizadas, clarificadas a 3000 x g por 10 min a 4°C e os sobrenadantes estocados a -20°C.

4.3 Ensaio imunoenzimático para a pesquisa de rotavírus da espécie A

Foi realizado Ensaio Imunoenzimático para triagem das amostras positivas para RVA (Ridascreen[®], R-Biopharm A.G.), seguindo as instruções do fabricante. Este método tem por princípio a detecção de antígenos da proteína VP6 dos RVA.

4.4 Extração de ácidos nucleicos

A extração de ácidos nucleicos foi realizada em todas as amostras a partir de sobrenadantes homogeneizados e clarificados de suspensões fecais pelo método descrito por Boom e colaboradores (1990). Resumidamente: em

tubo de poliestireno tipo Eppendorf® de 1,5mL foram adicionados 1 mL de tampão L6 e 400µL de suspensão fecal a 10%, previamente preparada, seguido de 15µL de sílica. Após agitação orbital por 20 minutos, as suspensões foram centrifugadas a 16.000 x g por 60 segundos, descartando-se o sobrenadante em solução de NaOH 10N. Em cada tubo, foi adicionado 1 mL de tampão L2, seguido de agitação em vórtex para ressuspensão do sedimento formado. Nova centrifugação foi realizada a 16.000 x g por 60 segundos e o sobrenadante foi descartado em solução de NaOH 10N. A seguir, foram realizadas duas etapas de lavagens, na primeira, adicionando-se 1 mL de etanol a 70% a 4°C e, na segunda, 1 mL de acetona P.A (Merck®) na mesma temperatura, utilizando-se os mesmos procedimentos de homogeneização e sedimentação anteriormente descritos, desprezando-se o sobrenadante em solução de hipoclorito de sódio a 5%. Após a última lavagem, os tubos foram incubados a 56° C por 15 minutos com as tampas abertas para completa evaporação da acetona. Após esse período, foram adicionados 60µL de água livre de endo e exonucleases (Invitrogen®) em cada tubo. Os tubos foram novamente homogeneizados em vórtex por 10 segundos, incubados a 56° C por 15 minutos com as tampas fechadas. Após a centrifugação a 16.000 x g por 3 minutos, 50µL do sobrenadante contendo o RNA foram coletados cuidadosamente, transferidos para outro tubo e armazenados a -70 °C. Controles negativos foram utilizados durante todos os procedimentos.

4.5 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA a partir do RNA extraído foi realizada utilizando-se o iniciador randômico contido no Kit High Capacity® (Applied Biosystems, USA), seguida de amplificação com iniciadores específicos. A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando a mistura de reagentes descrita no **Quadro 1**.

Foram adicionados 2 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) à 10 µL de RNA extraído e incubado a 97°C por 7 minutos. Após esse procedimento, os tubos foram incubados por 2 minutos em banho de gelo e foram adicionados 38µL da mistura de reagentes (RT) (**Quadro 1**). Utilizando o termociclador, os tubos

foram submetidos a temperatura de 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas e 85°C por 5 minutos. O produto foi estocado a 4°C até o momento da PCR.

Quadro 1. Mistura de reagentes utilizados na reação de transcrição reversa

Reagente	Concentração	Volume/Reação
H ₂ O livre de DNAase / RNAase (Invitrogen®)	-	14,8µL
Tampão RT (Applied Biosystems®)	10X	8,0 µL
dNTP Mix (Applied Biosystems®)	25X	3,2 µL
RT Iniciador Randômicos (Applied Biosystems®)	10X	8,0 µL
RT Multiscribe (Applied Biosystems®)	50 unidades	4,0 µL

4.6 Amplificação dos genes VP4, VP7 e NSP4 de rotavírus da espécie A

A mistura de reagentes utilizada para a amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP4, VP7 e NSP4 está descrita no **Quadro 2**. Controles negativos (água livre de ácidos nucleicos) foram utilizados durante todos os procedimentos desde a extração de ácidos nucleicos.

Quadro 2. Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase para a amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP4, VP7 e NSP4.

Reagentes	Concentração	Volume
H ₂ O livre de DNAase/RNAase (Invitrogen®)	-	31,25 µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen®)	10x	5 µL
dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen®)	2,5mM	4 µL
MgCl ₂ (Invitrogen®)	50mM	2,5 µL
Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen®)	5U/mL	0,25 µL
Oligonucleotídeos específicos para VP4: (F4P4D ¹ - 4con2 ²)/(4con3 ² - 4con2); para VP7: 9con1 ³ - 9con2 ³ / Beg9 ⁴ - End9 ⁴ para NSP4: FN4D ¹ - RN4D ¹	20µM (cada)	2 µL

¹Gómez *et al.*, 2011. ²Gentsch *et al.*, 1992. ³Das *et al.*, 1994. ⁴Gouvea *et al.*, 1990

As condições de termociclagem consistiram de uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos para a desnaturação, 50°C por 30 segundos para a hibridização dos iniciadores para o gene que codifica para VP4, 42°C para VP7, 55°C para NSP4 e 72°C por 1 minuto para a fase de extensão das fitas de DNA. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos.

4.7 Amplificação do gene que codifica para a proteína VP7 por RT-PCR.

A amplificação do gene que codifica para a proteína VP7 foi realizada utilizando o Kit *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen®), de acordo com as instruções descritas pelo fabricante. A mistura de reagentes utilizada está descrita no **Quadro 3**.

Em tubo de poliestireno de 200µL, foram adicionados 3µL de dimetil sulfóxido (DMSO) e 12µL do RNA extraído. Após incubação a 97°C por 7

minutos para desnaturação, o tubo foi mantido em banho de gelo por 2 minutos. A seguir foram adicionados 35µL da mistura de reação de amplificação (**Quadro 3**). Controles negativos foram utilizados durante todos os procedimentos desde a extração de ácidos nucléicos.

Quadro 3. Reagentes utilizados para amplificação dos genes que codificam para a proteína VP7.

Reagentes	Concentração	Volume
Reaction Mix (Invitrogen [®])	2X	25 µL
MgSO ₄ (Invitrogen [®])	5mM	8 µL
Enzyme Mix (Invitrogen [®])	2000 U/µL	1 µL
Oligonucleotídeos específicos VP7(Beg9 ¹ - End9 ¹)	20 Mm (cada)	1 µL
Total		25 µL

¹Gouvea *et al.* 1990

As condições de termociclagem consistiram de: uma etapa de RT a 55°C por 55 minutos; a etapa de desnaturação a 94°C por 5 minutos; 40 ciclos de amplificação de 94°C por 1 minuto na etapa de desnaturação; 55°C por 1 minuto para o hibridização dos iniciadores e 72°C por 2 minutos para a fase de extensão das fitas de DNA. A extensão final foi realizada a 72°C por 7 minutos.

4.8 Reação em cadeia pela polimerase em tempo real para detecção de norovírus dos Genogrupos I e II

Para triagem de amostras positivas para NoV foi realizado PCR em tempo real, conforme descrito por Pang *et al.* (2005) e adaptado por Fumian *et al.* (2009). Foram utilizados iniciadores específicos para NoV GI e GII, amplificando a sequência da junção das ORF1-ORF2 (**Quadro 4**). Controles negativos foram utilizados durante todos os procedimentos desde a extração de ácidos nucléicos.

Quadro 4. Oligonucleotídeos e sondas utilizados para detecção e quantificação dos norovírus.

Genogrupo alvo	Iniciadores/sonda (Polaridade)	Sequência 5´-3´	Posição no genoma	Tamanho do amplicon
GI	COG1F (+)	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	5291	85 pb
	COG1R (-)	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	5375	
	Sonda RING1a (-)	VIC-AGATYGCGATCYCCTGTCCA-TAMRA	5340	
	Sonda RING1b (-)	VIC-AGATCGCGGTCTCCTGTCCA-TAMRA	5340	
GII	COG2F (+)	CAR gAR BCN ATg TTY AgR Tgg ATg Ag	5003	98 pb
	COG2R (-)	TCg ACG CCA TCT TCA TTC ACA	5100	
	Sonda RING2 (+)	FAM – Tgg gAg ggC gAT CgC AAT CT-TAMRA	5048	

I: inosina, R: purina (A/G), Y: pirimidina (C/T), S: (C/G), W: (A/T).

As amostras foram aplicadas em duplicatas em microplaca com 96 orifícios (MicroAmp[®], Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, EUA), contendo 5 µL de cDNA e 20µL da mistura (**Quadro 5**) para volume final de 25µL. Inicialmente as amostras foram submetidas à temperatura de 50°C por 2 minutos e, posteriormente, à desnaturação a 95°C por 10 minutos e 45 ciclos subsequentes de desnaturação (95°C/15 segundos) e ciclo de hibridização e extensão (56°C/1 minuto).

Os dados de amplificação e quantificação foram coletados e analisados no software Sequence Detector versão 1.6 (Applied Biosystems). Em cada reação, foram geradas curvas padrão específicas para NoV GI e GII pela adição de 5 µL da diluição seriada (1:10) do plasmídeo recombinante purificado, contendo o inserto de NoV GI e GII nas concentrações de 10⁵ a 10¹ cópias por reação. A curva apresentou “threshold cycle” (Ct) 37. O método obteve limite de detecção de 10 partículas (cópias)/ mL.

Quadro 5. Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase em tempo real.

Reagente	Volume/Reação
H ₂ O livre de Dnase/Rnase (Invitrogen [®])	3,875µL
Taq Man [®] Universal PCR Master MIX (Invitrogen [®])	12,5µL
Primer COG 2F [10µM]	1,5µL
Primer COG 2R [10µM]	1,5µL
Sonda RING2 [10µM]	0,625µL
Primer COG 1F [10µM]	1,5µL
Primer COG 1R [10µM]	1,5µL
Sonda RING1A [10µM]	0,625µL
Sonda RING1B [10µM]	0,625µL

4.9 Determinação dos genótipos de norovírus através da amplificação da região D por PCR

Foram utilizados os iniciadores Cap C, D1 e D3 para amplificação de um fragmento da região do genoma que codifica para a proteína do capsídeo (região D) (Vinjé *et al.*, 2004). Como descrito a seguir: em um tubo de 200µL foram adicionados 10µL de cDNA em 40µL da mistura para volume final de 50µL (**Quadro 6**).

As amostras foram submetidas à desnaturação inicial à 95°C por 3 minutos e 40 ciclos subsequentes de desnaturação (94°C/1 minuto), hibridização (44°C/1 minuto), extensão (72°C/1 minuto) e um ciclo de extensão final (72°C/10 minutos), sendo mantidas à temperatura de 4°C por até 24 horas. Os tubos foram colocados no termociclador - Termocicler

Applied Biosystems[®], Foster City, CA, USA – modelo 2400.

Quadro 6. Reagentes utilizados na PCR para amplificação da região D dos norovírus.

Reagentes	Concentração	Volume/Reação
H ₂ O livre de Dnase/Rnase (Invitrogen [®])	-	26,20µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen [®])	10X	5,0µL
dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen [®])	2,5mM	4,0µL
MgCl ₂ (Invitrogen [®])	50mM	1,5µL
Taq DNA polimerase platinum (Invitrogen [®])	5U/µL	0,3µL
Mistura de iniciadores CAP C /D1/D3 ¹	100µM	3,0µL

¹.Vinjé *et al.*, 2004

4.10 Iniciadores de cadeia utilizados nas reações de detecção e sequenciamento

No **Quadro 7**, estão descritos os iniciadores utilizados nas reações de amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP4, VP7 e NSP4 de RVA. Os mesmos foram utilizados no seqüenciamento destes genes.

Quadro 7. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes NSP4, VP4 e VP7 de rotavirus da espécie A.

Gene	Nome do oligonucleotídeo (polaridade)	Sequência sentido 5´ - 3´	Posição do oligonucleotídeo (nt) no genoma viral
NSP4	FN4D (+)	CGG AAA AGA TGG AAA AGC	1 - 18
NSP4	RN4D (-)	GGA TTG GTT AAA CGG GA T	673-656
VP4	F4P4D (+)	GCATGGCTTCACTCATTATAGAC	1 - 22
VP4	4 con 2 (-)	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	887 – 868
VP4	4con3 (+)	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	11-32
VP7	9con1 (+)	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG	37-56
VP7	9con2 (-)	GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA	941-922
VP7	Beg9 (+)	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	1 - 28
VP7	End9 (-)	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	1062-1036

No **Quadro 8**, estão descritos os iniciadores utilizados nas reações de amplificação parcial do gene que codifica para o capsídeo (Região D) de NoV. Os mesmos foram utilizados no seqüenciamento deste gene.

Quadro 8. Oligonucleotídeos utilizados para genotipagem das amostras positivas para norovírus

Nome do Oligonucleotídeo (polaridade)	Sequências 5´-3´	Posição no genoma (nt)
Cap C (-)	CCT TYC CAK WTC CCA Ygg	6667-6684
Cap D1 (+)	TgT CTR STC CCC CAg GAA Tg	6432-6451
Cap D3 (+)	TgY CTY ITI CCH CAR gAA Tgg	6432-6452

I: inosina, R: purina (A/G), Y: pirimidina (C/T), S: (C/G), W: (A/T).

4.11 Análise dos amplicons por eletroforese em gel de agarose a 1,5%

Para análise dos *amplicons* obtidos nos itens anteriores, 2µL de corante azul de bromofenol (Invitrogen®) foram adicionados a 10µL dos produtos da RT-PCR e os mesmos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (GIBCO-BRL®) a 1,5% em tampão TBE 0,5% (GIBCO-BRL®) por 1 hora a 100 Volts. Após a impregnação de 20 minutos com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), os *amplicons* foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Labnet®) e as imagens registradas em sistema de captura de imagem (BioImaging Systems®) utilizando o programa Labworks 4.0.

Controles negativos (água livre de ácidos nucléicos) foram utilizados durante todos os procedimentos desde a extração de RNA.

4.12 Purificação dos produtos amplificados para sequenciamento

A purificação dos produtos amplificados foi realizada utilizando-se o *kit* comercial “QIAquick® PCR Purification Kit” (QIAGEN™, Valencia, CA, USA), quando apenas a banda esperada foi obtida.

Quando observada a presença de bandas inespecíficas, a purificação do produto foi realizada pela extração em gel de agarose utilizando o “QIAquick® Gel Extraction Kit” (QIAGEN™, Valencia, CA, USA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

4.13 Sequenciamento dos genes amplificados

O sequenciamento foi realizado pela Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/Fiocruz. Segundo orientação da plataforma, de 100 a 250 picomoles de DNA purificado e 3,2 picomoles dos iniciadores utilizados na PCR foram adicionados 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 recomendações do fabricante.

Os cromatogramas das seqüências 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.

4.14 Análise das seqüências

As seqüências obtidas foram alinhadas e editadas no BioEdit Sequence Alignment Editor (version 6.0.5.2). As amostras de referência e protótipos utilizadas neste estudo foram obtidas a partir do *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) através da ferramenta “Blast”.

As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no *GenBank* com o objetivo de definir os dendogramas correspondentes. Para as análises filogenéticas, foi utilizado o programa MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al.*, 2007) 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.

A partir das sequências nucleotídicas editadas, sequências de aminoácidos foram deduzidas com a utilização do programa *Bioedit*. A **tabela 2** lista os aminoácidos e as suas respectivas abreviações.

Tabela 2. Aminoácidos e suas respectivas abreviações

Aminoácidos	Abreviação
Glicina	G
Alanina	A
Leucina	L
Valina	V
Isoleucina	I
Prolina	P
Fenilalanina	F
Serina	S
Treonina	T
Cisteína	C
Tirosina	Y
Asparagina	N
Glutamina	Q
Aspartato	D
Glutamato	E
Arginina	R
Lisina	K
Histidina	H
Triptofano	W
Metionina	M

5. RESULTADOS

5.1 Detecção e perfil epidemiológico dos rotavírus da espécie A

Dentre as 200 amostras analisadas nesse estudo, 24 (12%) foram positivas para RVA, através do EIA. A **Figura 19** representa os dados de distribuição temporal relativa da detecção de RVA em Fortaleza, CE entre maio de 2008 e abril de 2009. Foi observada maior prevalência de RVA no mês de junho de 2008.

A distribuição geográfica dos casos de RVA, neste período, na cidade de Fortaleza, CE está representada na **Figura 20**.

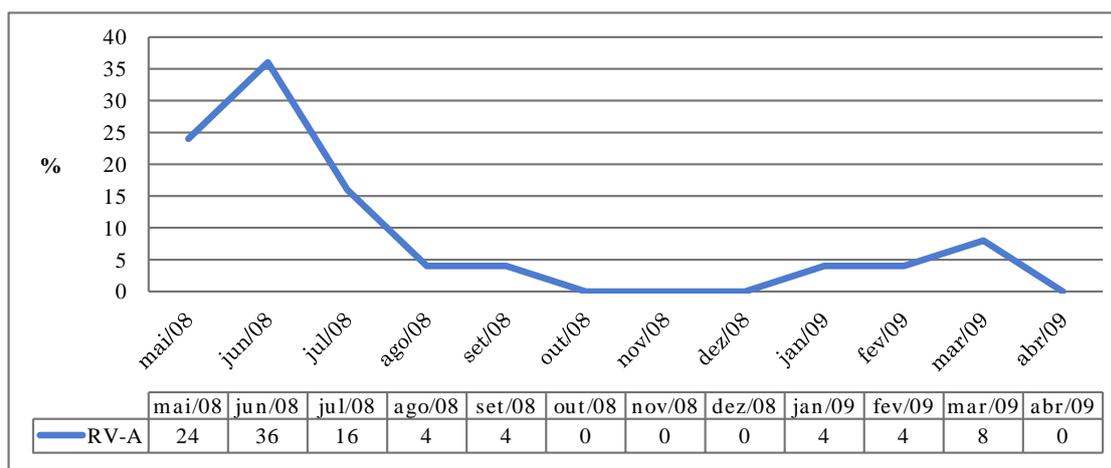


Figura 19. Distribuição anual relativa em porcentagem de detecção de rotavírus da espécie A, em Fortaleza, CE, de maio de 2008 a abril de 2009.

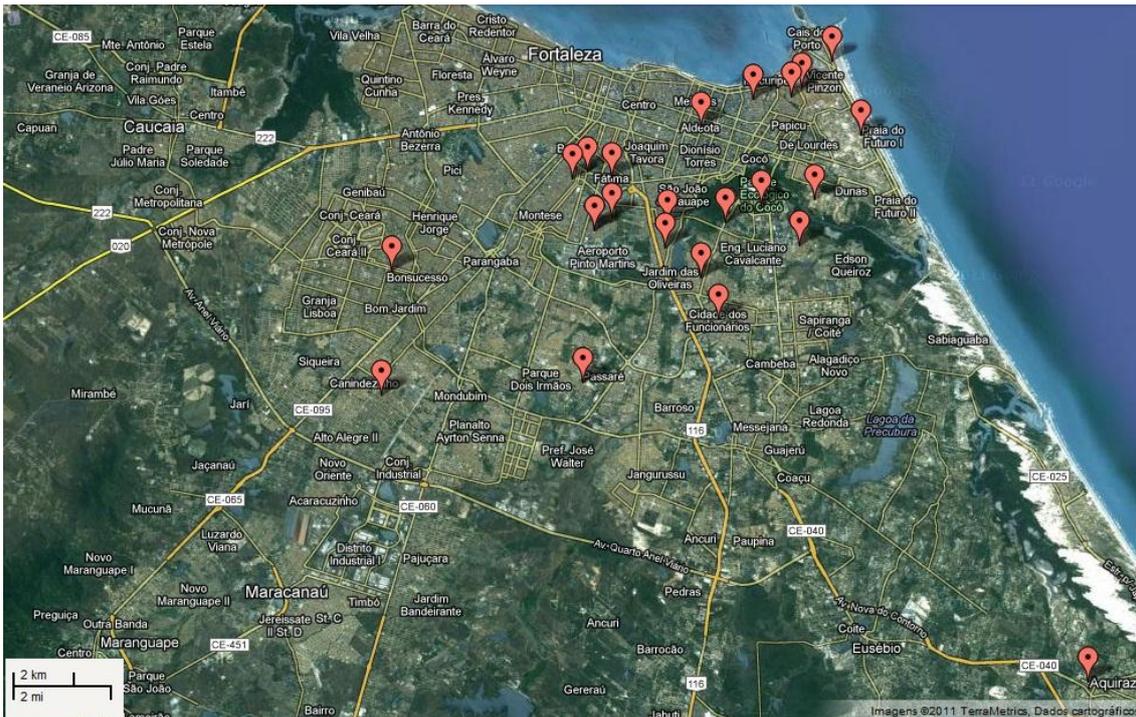


Figura 20. Distribuição geográfica das amostras positivas para rotavírus da espécie A na cidade de Fortaleza, CE, de maio de 2008 a abril de 2009. Fonte: Google® Imagens e Dados Cartográficos Maplink, 2011.

Na **Tabela 3**, estão descritos os grupos etários das crianças participantes deste estudo. O percentual no grupo de 0 a 24 meses foi majoritário, com 58% (12/24). A **Figura 21** apresenta o percentual cumulativo da distribuição dos grupos etários das crianças que apresentaram espécimes clínicos positivos para RVA. Este gráfico revela que 91,6% das amostras positivas para RVA encontram-se no grupo de 0 a 60 meses (5 anos).

Tabela 3. Distribuição por grupo etário de casos de infecções por rotavírus da espécie A em crianças cearenses com gastroenterite aguda.

Grupo etário (meses)	Amostras analisadas	RVA positivas
≤6	22	2
6 –12	30	4
13 –24	38	8
25 –36	37	5
37-48	17	2
49-60	6	1
61-72	7	0
73-84	6	0
84-96	6	0
≥97	31	2
TOTAL	200	24 (12%)

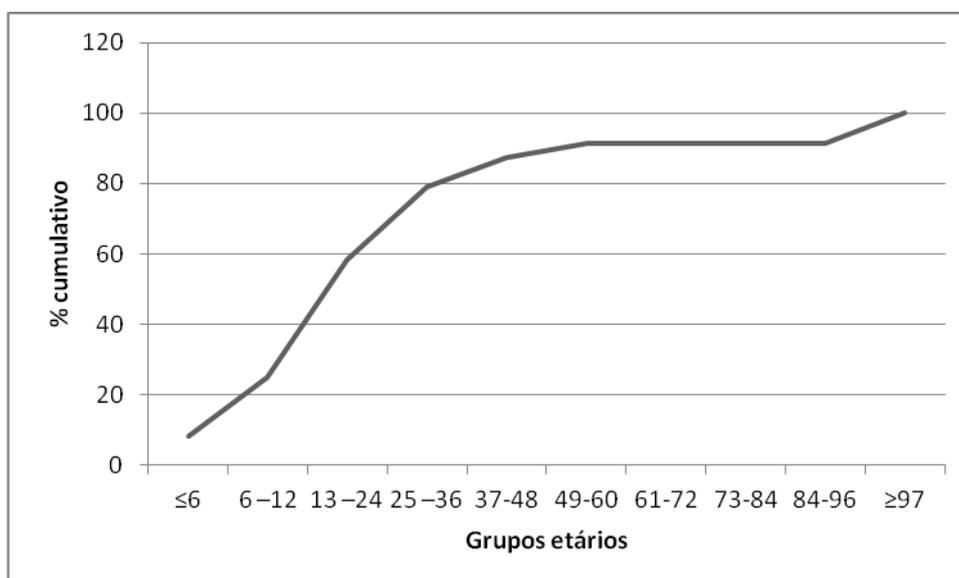


Figura 21. Percentual cumulativo da distribuição dos grupos etários das crianças que apresentaram espécimes clínicos positivos para rotavírus da espécie A, neste estudo, conduzido em Fortaleza, CE, de maio de 2008 a abril de 2009.

Informações sobre outras manifestações clínicas, além de diarreia, foram relatadas pelos pacientes ou por seus acompanhantes. Estas informações, provenientes dos pacientes cujas amostras foram positivas para RVA, estão descritas na **Tabela 4**. Neste grupo, a manifestação clínica mais comum foi o vômito em 92% (22/ 24), seguido por dor abdominal em 79% (19/24).

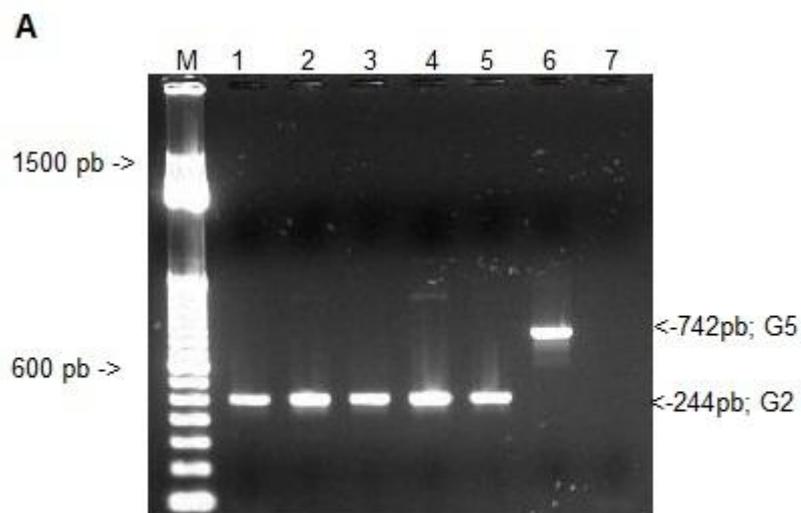
Tabela 4. Manifestações clínicas, além de diarreia, relatadas pelos pacientes com infecção por rotavírus da espécie A.

Manifestações Clínicas	RVA	
	positivas (n=24)	%
Vômito	22	92
Dor abdominal	19	79
Febre ($\geq 37,5^\circ$)	14	58
Sangue nas fezes	2	8

5.2 Caracterização molecular dos rotavírus da espécie A detectados em Fortaleza, Ceará

5.2.1 Genotipagem das amostras

Todas as amostras positivas no EIA (n=24) foram amplificadas pelos oligonucleotídeos específicos para os genes que codificam para as proteínas VP7 e VP4 por RT-PCR *semi-nested*, sendo todos caracterizados como genótipo G2P[4] (**Figura 22**).



B

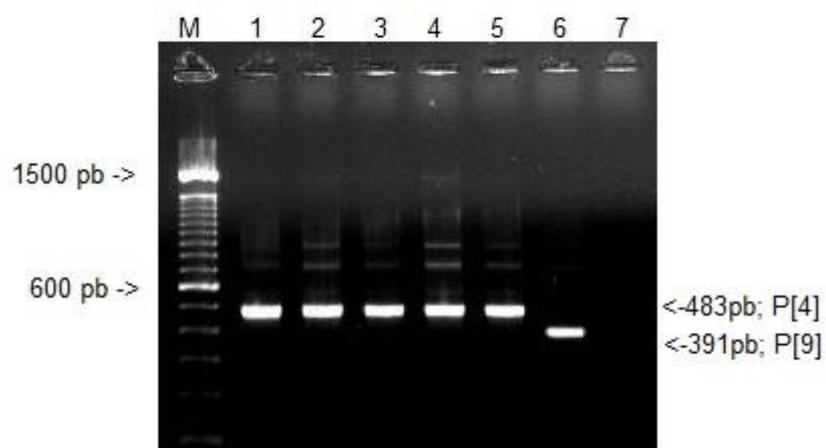


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produtos de RT-PCR semi-nested específica para os genes que codificam para as proteínas VP7 (A) e VP4 (B) de rotavírus da espécie A (RVA). M: marcador de tamanho molecular de 50 pb (A) e de 100 pb (B) (Invitrogen® Corporation). **A:** Linhas 1 a 5: amostras positivas para RVA, linha 6: controle positivo, linha 7: controle negativo.

5.2.2 Amplificação dos genes que codificam para as proteínas VP4, VP7 e NSP4 para análise por sequenciamento

As 24 amostras positivas tiveram os genes que codificam para as proteínas VP4, VP7 e NSP4 amplificados e sequenciados. A **Figura 23** apresenta a análise por eletroforese em gel de agarose da amplificação destes genes.

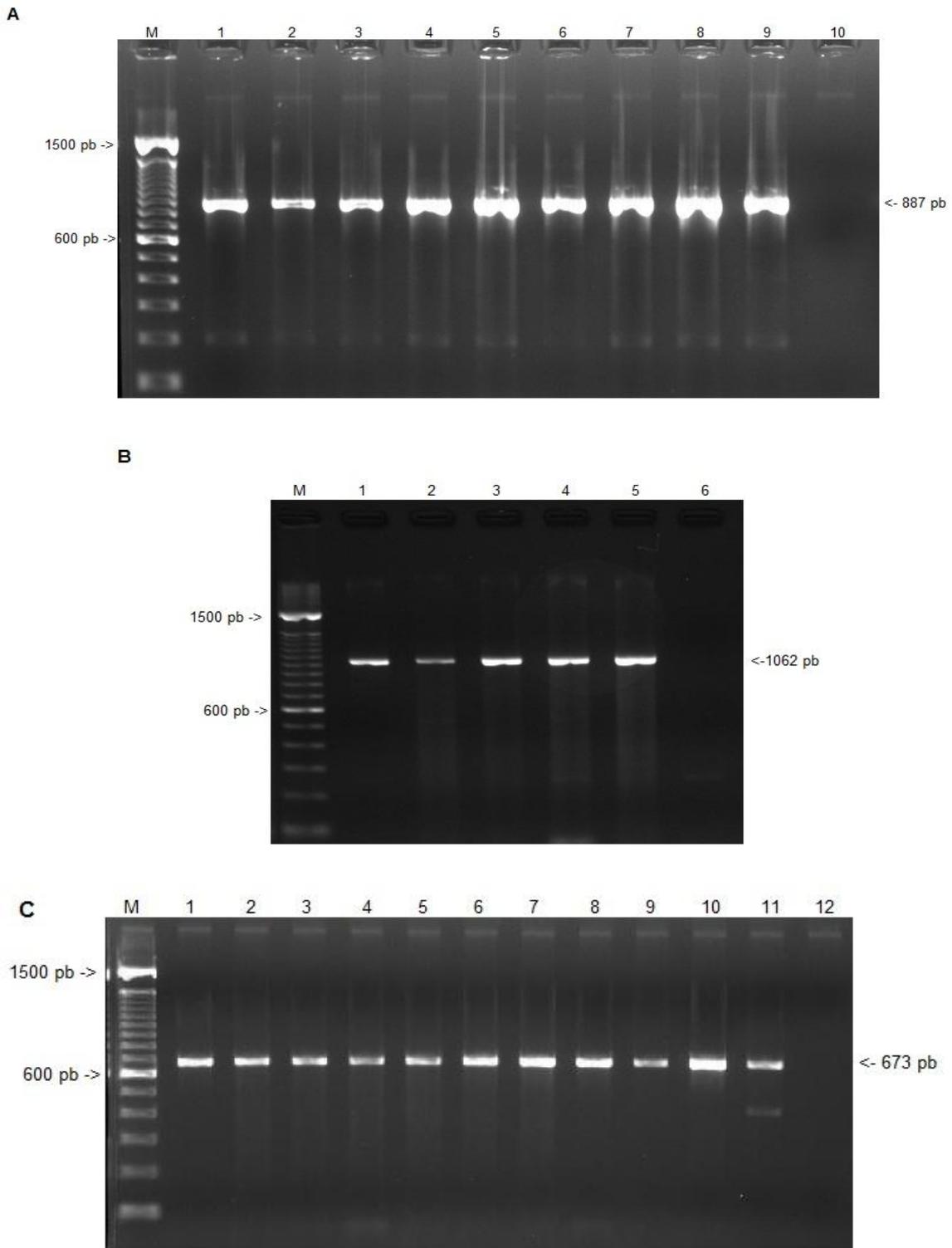


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de RT-PCR para os genes que codificam para as proteínas VP4 (VP8*) (A), VP7 (B) e NSP4 (C) de rotavírus da espécie A. M: marcador de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen® Corporation). **A:** Linhas 1 a 9: amostras positivas que amplificaram o gene que codifica para VP4, linha 10: controle negativo; **B:** Linha 1 a 5: amostras positivas que amplificaram o gene que codifica para VP7, linha 6: controle negativo; **C:** linhas 1 a 11: amostras positivas que amplificaram o gene que codifica para NSP4, linha 12: controle negativo.

De acordo com a nova classificação proposta para RVA, as amostras deste estudo foram caracterizadas como pertencentes ao genótipo G2-P[4]-E2 para os genes que codificam para as proteínas VP7, VP4 e NSP4, respectivamente, após análise por sequenciamento destes genes.

5.2.3 Análise filogenética

Árvores filogenéticas foram construídas, utilizando sequências nucleotídicas dos genes que codificam para as proteínas VP4, VP7 e NSP4, com a finalidade de avaliar a diversidade genética dos RVA. Estudos comparativos foram conduzidos com sequências de amostras protótipos, disponíveis no *GenBank*. Para a análise, foram incluídas amostras genótipo G2P[4] detectadas em diferentes regiões do Brasil e do mundo.

Foram observados topologia e valores de suporte estatístico (*bootstrap*) semelhantes nas árvores filogenéticas construídas com diferentes métodos de inferência filogenética e modelos evolutivos de determinação de distância genética entre as sequências nucleotídicas (dados não mostrados).

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

A **Figura 24** representa a análise filogenética baseada na sequência nucleotídica parcial (887 pb) do gene que codifica para a proteína VP4, compreendendo a sequência nucleotídica completa da proteína VP8*.

Pela análise filogenética, foi possível determinar que as amostras deste estudo pertencem à sublinhagem P[4]-5, apresentando valores de identidade de 0,94 a 0,97 com a amostra protótipo da sublinhagem TB-Chen (AY787644).

No *cluster A*, as amostras deste estudo, isoladas em 2008, agruparam-se com amostras de 2006 a 2009, isoladas nas regiões Norte (Pará), Nordeste (Sergipe), Sudeste (Rio de Janeiro e Minas Gerais) e Sul (Rio

Grande do Sul) do Brasil. Foram encontradas, neste grupo, amostras de outros países, tais como Coréia do Sul, Estados Unidos e Tailândia dos anos 2001, 2005 e 2008, respectivamente (**Figura 24**).

As amostras isoladas de janeiro a abril de 2009 formaram dois *clusters*, indicados por A e B na **Figura 24**. Deve-se ressaltar que, mesmo em grupos distintos, a identidade entre a maioria (96%) das amostras dos dois grupos foi de 0,98 a 1 (**Quadro 9**).

No *cluster* B, as amostras isoladas em 2009 compõem o grupo com amostras brasileiras das regiões Norte (Pará) e Sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo) detectadas em 2008 e 2009. Além destas, há amostras dos países: Rússia (2005 e 2008) e Coréia do Sul (2009) (**Figura 24**).

A **Figura 25** representa o alinhamento da sequência parcial de aa (281aa) da proteína VP4 de amostras deste estudo, em relação às amostras protótipo G2P[4]: DS-1 (EF672577), TB-CHEN (AY787644) e L26 (EF672591).

Na análise parcial de aa de VP4, que compreende a totalidade da sequência de VP8* (aa 8 a 247), foram identificadas algumas substituições, em diferentes posições da proteína, sendo que, apenas 120^{I→V} está localizada em um dos sítios antigênicos da proteína VP8* (**Figura 25**).

As amostras pertencentes ao *cluster* A apresentaram variação de aa nas posições 130^{V→I} e 147^{S→G}. As amostras que agruparam no *cluster* B apresentaram substituições de aa nas posições 162^{R→K}, 279^{V→I}, sendo apenas esta compartilhada com a amostra 18682 do *cluster* A.

Em alguns casos, a indisponibilidade de sequências no *GenBank* impossibilitou a utilização das mesmas amostras para análises filogenéticas para VP7 e VP4 (VP8*).

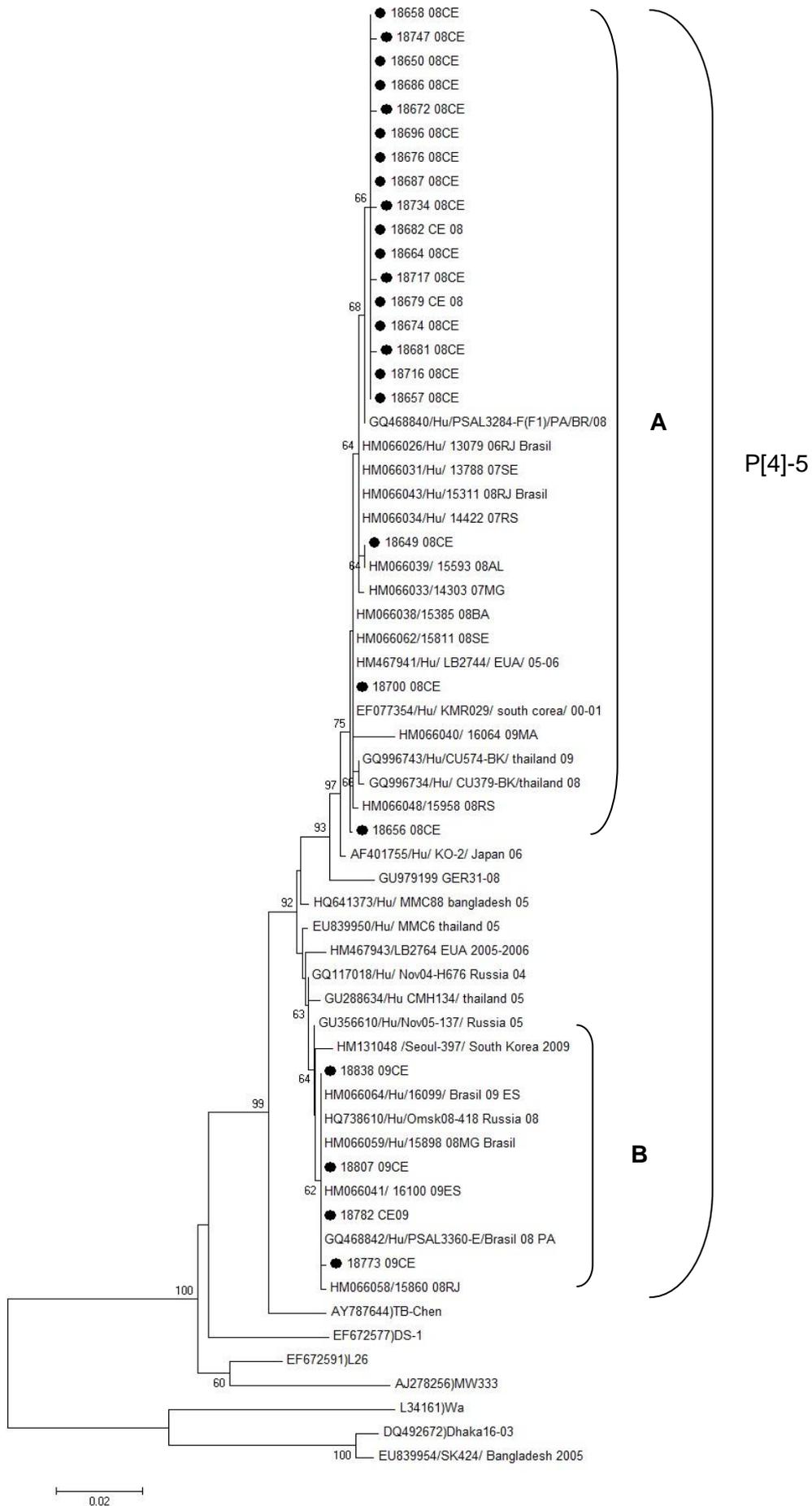


Figura 24. Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica parcial (887 pb) do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) de amostras de rotavírus da espécie A provenientes de Fortaleza, CE, coletadas de maio de 2008 a abril de 2009 (círculo preenchido), e amostras de referência e protótipos representantes de diferentes genótipos humanos. Os valores de Bootstrap (2.000 réplicas) estão indicados na árvore filogenética, valores menores que 60% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

Quadro 9. Identidade^a nucleotídica e aminoacídica, baseada na sequência parcial do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) de amostras coletadas em Fortaleza, CE, de maio de 2008 a abril de 2009.

Amostra	18650_ORCE	18657_ORCE	18658_ORCE	18664_ORCE	18672_ORCE	18674_ORCE	18676_ORCE	18679_ORCE	18682_ORCE	18681_ORCE	18686_ORCE	18687_ORCE	18696_ORCE	18716_ORCE	18717_ORCE	18734_ORCE	18747_ORCE	18649_ORCE	18656_ORCE	18700_ORCE	18782_ORCE	18773_ORCE	18807_ORCE	18838_ORCE
18650_ORCE		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
18657_ORCE	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,98	0,97	0,98	0,98
18658_ORCE	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,98	0,97	0,98	0,98
18664_ORCE	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,98	0,97	0,98	0,98
18672_ORCE	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,97	0,97	0,97	0,97
18674_ORCE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,98	0,97	0,98	0,98
18676_ORCE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,98	0,97	0,98	0,98
18679_ORCE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,98	0,97	0,98	0,98
18682_ORCE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98
18681_ORCE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,98	0,97	0,98	0,98
18686_ORCE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
18687_ORCE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
18696_ORCE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,98	0,97	0,98	0,98
18716_ORCE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,98	0,97	0,98	0,98
18717_ORCE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,98	0,97	0,98	0,98
18734_ORCE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00		1,00	0,99	0,99	0,99	0,98	0,97	0,98	0,98
18747_ORCE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99		0,99	0,99	0,99	0,98	0,97	0,98	0,98
18649_ORCE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99		0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98
18656_ORCE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00		1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
18700_ORCE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00		0,98	0,98	0,98	0,98
18782_ORCE	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99		1,00	1,00	1,00
18773_ORCE	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	1,00		1,00	1,00
18807_ORCE	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00		1,00
18838_ORCE	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	

^a A porcentagem de identidade nucleotídica e aminoacídica estão indicadas acima e abaixo da diagonal, respectivamente.

	*												
	32	89	99	120	130	133	147	149	160	162	230	279	
EF672577/DS-1	S	N	N	I	V	N	S	G	S	R	S	V	
AY787644/ TB-Chen	N	D	S	S	N	.	R	.	
EF672591/ L26	N	D	S	.	I	.	.	S	N	.	R	.	
18650_08CE	N	D	S	V	I	S	G	S	N	.	R	.	
18657_08CE	N	D	S	V	I	S	G	S	N	.	R	.	
18658_08CE	N	D	S	V	I	S	G	S	N	.	R	.	
18664_08CE	N	D	S	V	I	S	G	S	N	.	R	.	
18672_08CE	N	D	S	V	I	S	G	S	N	.	R	.	
18674_08CE	N	D	S	V	I	S	G	S	N	.	R	.	
18676_08CE	N	D	S	V	I	S	G	S	N	.	R	.	
18679_CE08	N	D	S	V	I	S	G	S	N	.	R	.	
18682_CE08	N	D	S	V	I	S	G	S	N	.	R	I	
18681_CE08	N	D	S	V	I	S	G	S	N	.	R	.	
18686_08CE	N	D	S	V	I	S	G	S	N	.	R	.	
18687_CE08	N	D	S	V	I	S	G	S	N	.	R	.	
18696_CE08	N	D	S	V	I	S	G	S	N	.	R	.	
18716_ce08	N	D	S	V	I	S	G	S	N	.	R	.	
18717_08CE	N	D	S	V	I	S	G	S	N	.	R	.	
18734_08CE	N	D	S	V	I	S	G	S	N	.	R	.	
18747_08CE	N	D	S	V	I	S	G	S	N	.	R	.	
18649_CE08	N	D	S	V	I	S	.	S	N	.	R	.	
18656_08CE	N	D	S	V	I	S	.	S	N	.	R	.	
18700_08CE	N	D	S	V	I	S	.	S	N	.	R	.	
18782_CE09	N	D	S	V	.	S	.	S	N	K	R	I	
18773_09CE	N	D	S	V	.	S	.	S	N	K	R	I	
18807_09CE	N	D	S	V	.	S	.	S	N	K	R	I	
18838_09CE	N	D	S	V	.	S	.	S	N	K	R	I	

Figura 25. Alinhamento das sequências parciais (281 aa) de aminoácidos da proteína VP4 (VP8*) de amostras coletadas em Fortaleza, CE, de maio de 2008 a abril de 2009, e amostras protótipos. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade de aminoácido com a amostra protótipo DS-1 (EF672577). O asterisco (*) indica as substituições aminoacídicas em um dos sítios antigênicos para a proteína VP8*.

5.2.5 Análise do gene que codifica para a proteína VP7

As análises das sequências obtidas a partir do gene VP7 das amostras estudadas permitem caracterizá-las como G2, sublinhagem II. A **Figura 26** mostra a árvore filogenética gerada após alinhamento das sequências parciais (850 pb) do gene que codifica para a proteína VP7.

No **Quadro 10**, estão descritas as identidades nucleotídica e aminoacídica entre as amostras deste estudo. Foi realizada comparação dessas com algumas amostras protótipos e os valores de identidade nucleotídica obtidos revelaram que todas as amostras deste estudo apresentaram maior identidade com o gene que codifica para a proteína VP7 da amostra protótipo N1 (DQ478584).

As amostras deste estudo formaram quatro *clusters*: A1, A2, A3 e B. Nos *clusters* A1 e A2, as amostras analisadas foram agrupadas apenas entre si. No cluster A3, as amostras do presente estudo demonstram estreita relação genética com amostras circulantes em Alagoas, Sergipe, Pernambuco, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul nos anos de 2007 e 2008 (**Figura 26**).

No *cluster* B, as amostras do ano de 2009 foram agrupadas com amostras que circularam em Bangladesh, em 2002; na Alemanha, em 2008 e na Coreia do Sul, em 2009.

O alinhamento das sequências aminoacídicas das amostras deste estudo com amostras protótipos G2 evidenciou a ocorrência de várias substituições de aa, em diferentes posições da proteína quando comparada com o protótipo DS-1 (AB118023) (**Figura 27**). Destas substituições, 4; 87^{A→T}, 95^{D→N}, 213^{N→D}; ocorreram nos sítios antigênicos da proteína.

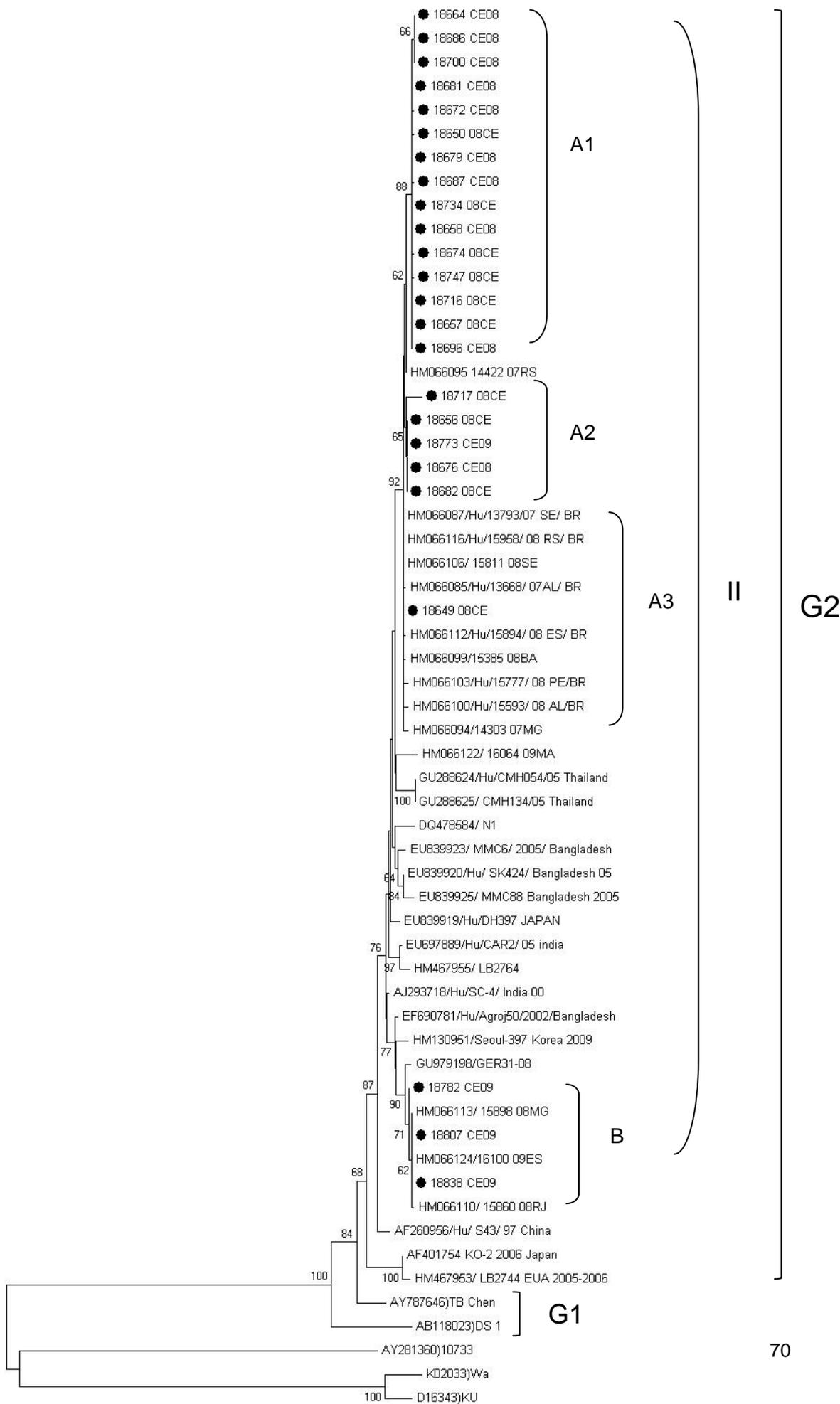


Figura 26. Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica parcial (850 pb) da região codificante da proteína VP7 de amostras de rotavírus da espécie A detectados em Fortaleza, CE, coletadas de maio de 2008 a abril de 2009 (círculo preenchido) e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de Bootstrap (2.000 réplicas) estão indicados na árvore filogenética, valores menores que 60% não estão representados. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

Quadro 10. Identidade nucleotídica^a e de aminoácidos, baseada na sequência parcial do gene que codifica para a proteína VP7 de amostras coletadas em Fortaleza, CE, de maio de 2008 a abril de 2009.

VP7	18649_08CE	18650_08CE	18656_08CE	18657_08CE	18658_08CE	18664_08CE	18672_08CE	18674_08CE	18676_08CE	18679_08CE	18681_08CE	18682_08CE	18686_08CE	18687_08CE	18696_08CE	18700_08CE	18716_08CE	18717_08CE	18734_08CE	18747_08CE	18773_09CE	18782_09CE	18807_09CE	18838_09CE
18649_08CE		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
18650_08CE	0,99		0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
18656_08CE	1,00	0,99		1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98
18657_08CE	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
18658_08CE	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
18664_08CE	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00		1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
18672_08CE	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	0,99		1,00	0,99	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
18674_08CE	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	0,99	0,99		0,99	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
18676_08CE	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99		1,00	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98	
18679_08CE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
18681_08CE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
18682_08CE	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00		0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98
18686_08CE	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	0,99		1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
18687_08CE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
18696_08CE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
18700_08CE	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00		1,00	0,99	1,00	0,99	0,98	0,98	0,98	0,98
18716_08CE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		0,99	1,00	1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
18717_08CE	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99		0,99	0,99	0,97	0,97	0,97	0,97
18734_08CE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99		1,00	0,98	0,98	0,98	0,98
18747_08CE	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	0,99	1,00	0,98	1,00		0,98	0,98	0,98	0,98
18773_09CE	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99		1,00	1,00	1,00
18782_09CE	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,98	0,99	0,99	1,00		1,00	1,00
18807_09CE	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,98	0,99	0,99	1,00	1,00		1,00
18838_09CE	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	0,98	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	

^a A porcentagem de identidade nucleotídica e aminoácídica estão indicadas acima e abaixo da diagonal, respectivamente.

	44	49	66	75	87	95	112	123	126	178	213
(AB118023) DS 1	I	R	V	P	A	D	I	N	V	S	N
(K02033) Wa	L	.	.	V	T	G	T	V	.	.	D
(D16343) KU	L	.	.	V	T	G	T	V	.	.	D
(AY787646) TB Chen	.	.	.	S	.	.	T	T	M	N	D
DQ478584/ N1	M	.	.	S	T	N	T	T	M	N	D
18650_08CE	M	K	L	S	T	N	T	T	M	N	D
18657_08CE	M	K	L	S	T	N	T	T	M	N	D
18658_CE08	M	K	L	S	T	N	T	T	M	N	D
18664_CE08	M	K	L	S	T	N	T	T	M	N	D
18672_CE08	M	K	L	S	T	.	T	T	M	N	D
18674_08CE	M	K	L	S	T	N	T	T	M	N	D
18679_CE08	M	K	L	S	T	N	T	T	M	N	D
18681_CE08	M	K	L	S	T	N	T	T	M	N	D
18686_CE08	M	K	L	S	T	N	T	T	M	N	D
18687_CE08	M	K	L	S	T	N	T	T	M	N	D
18696_CE08	M	K	L	S	T	N	T	T	M	N	D
18716_CE08	M	K	L	S	T	N	T	T	M	N	D
18734_08CE	M	K	L	S	T	N	T	T	M	N	D
18747_08CE	M	K	L	S	T	N	T	T	M	N	D
18649_08CE	M	K	.	S	T	N	T	T	M	N	D
18656_08CE	M	K	.	S	T	N	T	T	M	N	D
18676_CE08	M	K	.	S	T	N	T	T	M	N	D
18682_08CE	M	K	.	S	T	N	T	T	M	N	D
18700_CE08	M	K	.	S	T	N	T	T	M	N	D
18717_08CE	M	K	I	S	T	N	T	T	M	N	D
18773_09CE	M	.	.	S	T	N	T	T	M	N	D
18782_CE09	M	.	.	S	T	N	T	T	M	N	D
18807_CE09	M	.	.	S	T	N	T	T	M	N	D
18838_CE09	M	.	.	S	T	N	T	T	M	N	D

Figura 27. Alinhamento das sequências aminoacídicas parciais (280 aa) da proteína VP7 de amostras coletadas em Fortaleza, CE, de maio de 2008 a abril de 2009, e amostras protótipos. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade de aminoácido com a amostra protótipo DS-1. Os asteriscos (*) indicam as regiões antigênicas A, C e F, nessa ordem.

5.2.6 Análise do gene que codifica para a proteína NSP4

A árvore filogenética gerada através do alinhamento das sequências completas do gene que codifica para NSP4 (**Figura 28**) mostra que todas as amostras caracterizadas neste estudo agruparam no mesmo *cluster* que as amostras protótipos correspondentes ao genogrupo KUN (D88829) e ao genótipo E2.

As análises filogenéticas revelaram que as amostras do presente estudo foram agrupadas em quatro *clusters*: A1, A2, A3 e B. Nos *clusters* A1 e A2, as amostras analisadas neste trabalho agruparam somente entre si. No *cluster* A3, as amostras deste estudo foram agrupadas com amostras brasileiras de 2008 ou 2009, detectadas no Maranhão e em Alagoas. No *cluster* B, as amostras de 2009 detectadas em Fortaleza agruparam com amostras provenientes do Sudeste brasileiro (Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo) e amostras isoladas na Alemanha e Rússia em 2008 ou 2009 (**Figura 28**).

As amostras que circularam em 2009, que compõem o *cluster* B, apresentaram estreita relação genética com a amostra 10.733 (G6P[3]), de origem bovina (Martella *et al.*, 2003), evidenciada pela identidade nucleotídica de 0,95 e aminoacídica de 0,98. Além disso, estas demonstraram identidade nucleotídica inferior a 0,9 quando comparadas às amostras do *cluster* A. (**Quadro 11**, em vermelho)

Todas as amostras deste estudo apresentaram substituições de aa nas posições 19^{N→S}, 45^{A→T} e 161^{N→S}, em relação ao protótipo DS-1 (**Figura 29**).

As amostras pertencentes ao *cluster* A demonstraram substituições de aa nas posições 76^{F→L}, 81^{K→N} e 103^{V→I}. Apenas a amostra 18682 mostrou mutação na posição 76^{F→I} (**Figura 29**).

As amostras detectadas em 2009, componentes do *cluster* B, apresentaram mutações correspondentes a mudança de aa na posição 154^{R→K}. (**Figura 29**).

É importante ressaltar, que as amostras coletadas em 2008 apresentaram mutação diferencial 135^{M→I} no domínio variável inter-espécie (aa 135 – 141), já as amostras de 2009 tiveram substituição na mesma posição, de metionina para valina (135^{M→V}) (**Figura 29**).

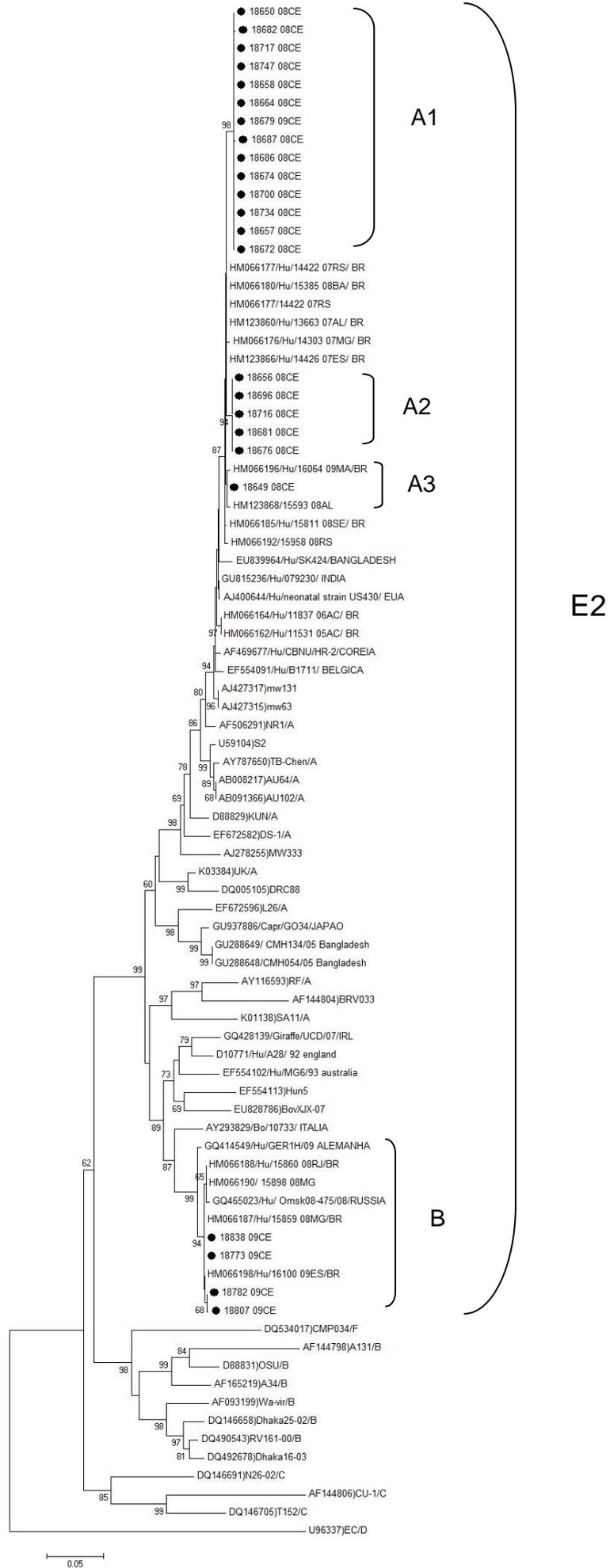


Figura 28. Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica completa (525pb) do gene que codifica para a proteína NSP4 das amostras coletadas em Fortaleza, CE, de maio de 2008 a abril de 2009 (círculo preenchido) e amostras protótipos representantes de diferentes genótipos humanos e animais. Os valores de Bootstrap (2.000 réplicas) estão indicados na árvore filogenética, valores menores que 60% não estão representados. A classificação segundo Matthijnssens e colaboradores (2008) está apresentada em negrito. A barra na parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

Quadro 11. Identidade nucleotídica^a e de aa do gene que codifica para a proteína NSP4 entre amostras cearenses de rotavírus da espécie A.

Amostras	18650_08CE	18657_08CE	18658_08CE	18664_08CE	18672_08CE	18674_08CE	18679_08CE	18682_08CE	18686_08CE	18687_08CE	18696_08CE	18716_08CE	18734_08CE	18747_08CE	18717_08CE	18700_08CE	18681_08CE	18676_08CE	18656_08CE	18649_08CE	18773_09CE	18782_09CE	18807_09CE	18838_09CE	
18650_08CE		0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,89	0,88	0,88	0,89	
18657_08CE	1,00		0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,89	0,88	0,88	0,89	
18658_08CE	1,00	1,00		0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99	0,89	0,89	0,89	0,89	
18664_08CE	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,89	0,88	0,88	0,89	
18672_08CE	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,89	0,88	0,88	0,89	
18674_08CE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,89	0,88	0,88	0,89	
18679_08CE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,89	0,88	0,88	0,89	
18682_08CE	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99		0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,89	0,88	0,88	0,89	
18686_08CE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99		0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99	0,89	0,89	0,89	0,89	
18687_08CE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00		0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,89	0,88	0,88	0,89	
18696_08CE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00		0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99	0,89	0,89	0,89	0,89	
18716_08CE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,89	0,88	0,88	0,89	
18734_08CE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,89	0,88	0,88	0,89	
18747_08CE	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,88	0,88	0,88	0,88	
18717_08CE	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99		0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	0,89	0,88	0,88	0,89	
18700_08CE	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00		0,99	1,00	0,99	0,99	0,89	0,89	0,89	0,89	
18681_08CE	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00		0,99	1,00	1,00	0,89	0,88	0,88	0,89	
18676_08CE	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00		0,99	0,99	0,89	0,89	0,89	0,89	
18656_08CE	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00	0,89	0,88	0,88	0,89	
18649_08CE	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00		0,89	0,88	0,88	0,89	
18773_09CE	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98		1,00	1,00	1,00
18782_09CE	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,99		1,00	1,00
18807_09CE	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,99	0,99		1,00	
18838_09CE	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,97	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	1,00	0,99	0,99		

^a A porcentagem de identidade nucleotídica e aminoacídica estão indicadas acima e abaixo da diagonal, respectivamente.

	19	45	76	81	103	135	154	161
EF672582DS-1	N	A	F	K	V	M	R	N
AY787650 TB-Chen	S	T	L	.	.	I	.	S
EF672596 L26	.	T	K	S
AF506291 NR1	S	T	L	.	.	I	.	S
D88829/ KUN/ A	S	T	L	.	.	I	.	S
AY293829/ Bov 10733	S	T	.	.	.	L	K	S
18650_08CE	S	T	L	N	I	I	.	S
18657_08CE	S	T	L	N	I	I	.	S
18658_08CE	S	T	L	N	I	I	.	S
18664_08CE	S	T	L	N	I	I	.	S
18672_08CE	S	T	L	N	I	I	.	S
18674_08CE	S	T	L	N	I	I	.	S
18679_08CE	S	T	L	N	I	I	.	S
18682_08CE	S	T	I	N	I	I	.	S
18686_08CE	S	T	L	N	I	I	.	S
18687_08CE	S	T	L	N	I	I	.	S
18696_08CE	S	T	L	N	I	I	.	S
18716_08CE	S	T	L	N	I	I	.	S
18734_08CE	S	T	L	N	I	I	.	S
18747_08CE	S	T	L	N	I	I	.	S
18717_08CE	S	T	L	.	I	I	.	S
18700_08CE	S	T	L	.	I	I	.	S
18681_08CE	S	T	L	.	I	I	.	S
18676_08CE	S	T	L	.	I	I	.	S
18656_08CE	S	T	L	.	I	I	.	S
18649_08CE	S	T	L	.	I	I	.	S
18773_09CE	S	T	.	.	.	V	K	S
18782_09CE	S	T	.	.	.	V	K	S
18807_09CE	S	T	.	.	.	V	K	S
18838_09CE	S	T	.	.	.	V	K	S

Figura 29. Alinhamento das sequências de aminoácidos completas (175 aa) da proteína NSP4 de amostras cearenses e de amostras protótipos de origem humana e animal. Os aminoácidos estão indicados pelo código de abreviação de uma letra. Os pontos simbolizam a identidade de aminoácido com a amostra protótipo DS-1. O asterisco (*) indica o domínio variável inter-espécie (aa 135 – 141).

5.2.7 Mecanismos de diversidade genética

Por meio de análises filogenéticas, foram evidenciados possíveis eventos de *reassortment* tanto intra-espécie (humano-humano), quanto inter-espécie (humano-bovino) (**Tabela 5**).

Tabela 5. Perfil dos genes que codificam para as proteínas VP4, VP7 e NSP4 de amostras analisadas neste estudo. Diferentes cores indicam origem do gene. As cores azul, laranja, roxo e verde indicam genes de origem humana, e a cor vermelha gene de origem bovina.

AMOSTRA	ANO	VP4	VP7	NSP4
18649	2008	Humana (laranja)	Humana (verde)	
18650	2008	Humana (laranja)	Humana (roxo)	
18656	2008	Humana (laranja)		
18657	2008	Humana (laranja)	Humana (roxo)	
18658	2008	Humana (laranja)		
18664	2008	Humana (laranja)		
18672	2008	Humana (laranja)		
18674	2008	Humana (laranja)		
18676	2008	Humana (laranja)	Humana (roxo)	
18679	2008	Humana (laranja)		
18681	2008	Humana (laranja)		Humana (roxo)
18682	2008	Humana (laranja)	Humana (roxo)	
18686	2008	Humana (laranja)		
18687	2008	Humana (laranja)		Humana (roxo)
18696	2008	Humana (laranja)		
18700	2008	Humana (laranja)	Humana (roxo)	
18716	2008	Humana (laranja)		
18717	2008	Humana (laranja)	Humana (roxo)	
18734	2008	Humana (laranja)		
18747	2008	Humana (laranja)		
18773	2009	Humana (azul)	Humana (roxo)	Bovina (vermelha)
18782	2009	Humana (azul)		Bovina (vermelha)
18807	2009	Humana (azul)		Bovina (vermelha)
18838	2009	Humana (azul)		Bovina (vermelha)

5.3 Detecção e perfil epidemiológico dos norovírus

Das 200 amostras analisadas neste estudo, 34 (17%) foram positivas para NoV, através do PCR em tempo real e todas foram caracterizadas como GII.

A amostra 18782, coletada em fevereiro de 2008, apresentou co-infecção por NoV e RVA.

A **Figura 30** dispõe os dados de distribuição temporal das amostras positivas para NoV. Maiores frequências de detecção deste vírus foram observadas nos meses de novembro de 2008 e fevereiro de 2009 em Fortaleza, CE.

A distribuição geográfica dos casos de infecção por NoV detectados neste estudo está apresentada na **Figura 31**.

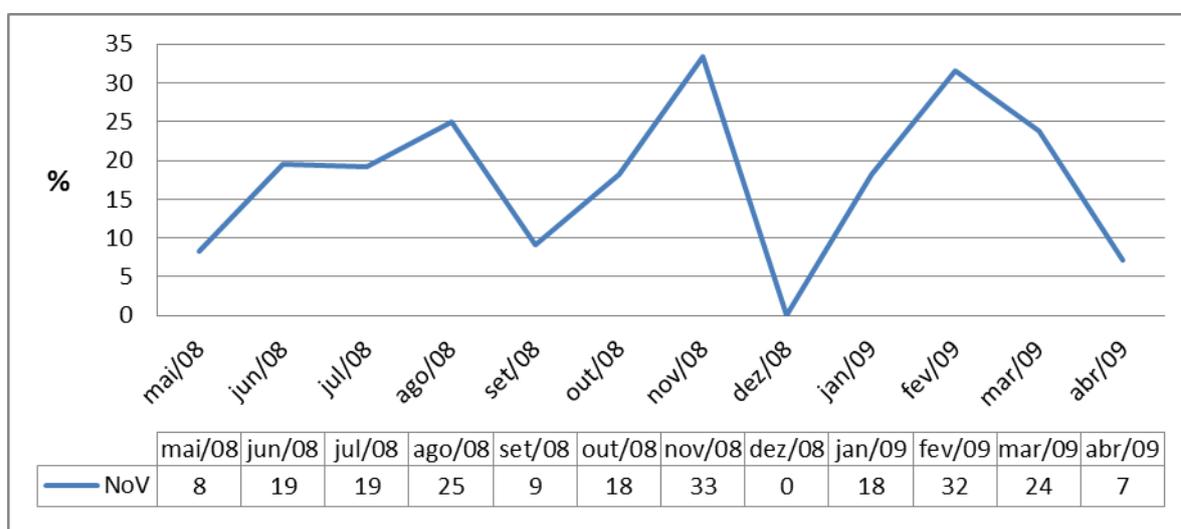


Figura 30. Distribuição anual relativa em porcentagem de detecção de norovírus em Fortaleza, CE, de maio de 2008 a abril de 2009.

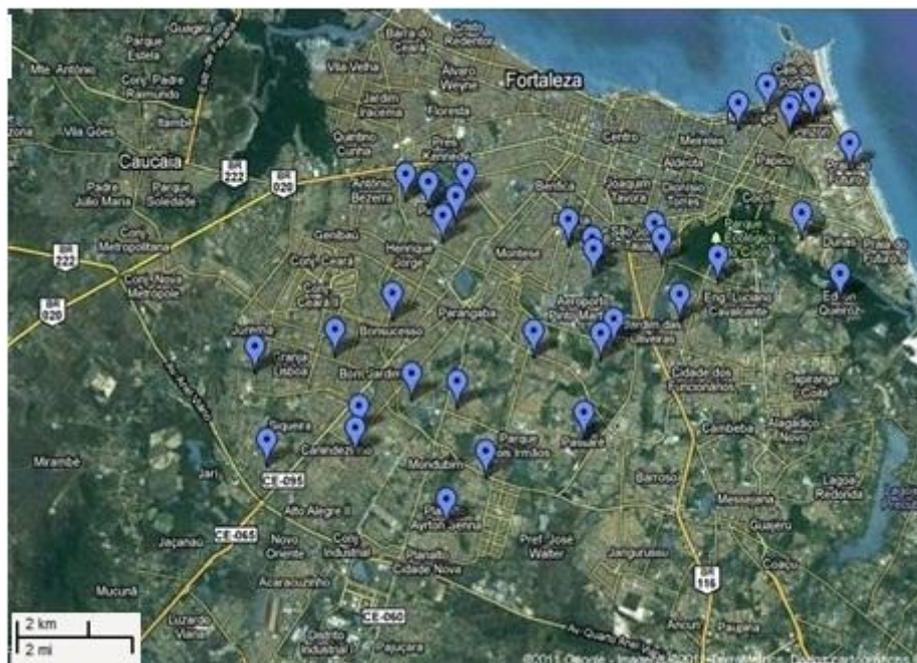


Figura 31. Distribuição geográfica das amostras positivas para norovírus coletadas na cidade de Fortaleza, CE, de maio de 2008 a abril de 2009. Fonte: Google® Imagens e Dados Cartográficos Maplink, 2011.

A distribuição por faixa etária e o número de casos positivos para NoV está na **Tabela 6**. As infecções por NoV foram detectadas em crianças de todos os grupos etários, sendo que a maior porcentagem dos casos positivos foi encontrada no grupo de 0 a 24 meses. A **Figura 32** apresenta o percentual cumulativo da distribuição dos grupos etários das crianças que apresentaram espécimes clínicos positivos para NoV. Este gráfico revela que 82,3% das amostras positivas para NoV encontram-se no grupo de 0 a 60 meses (5 anos).

Tabela 6: Distribuição por grupo etário dos casos de infecções por norovírus em crianças com gastroenterite aguda em Fortaleza, CE, de maio de 2008 a abril de 2009

Grupo etário (meses)	Amostras analizadas	NoV positivas
≤6	22	4
6-12	30	7
13-24	38	7
25-36	37	7
37-48	17	1
49-60	6	3
61-72	7	0
73-84	6	1
84-96	6	1
≥97	31	3
TOTAL	200	34 (17%)

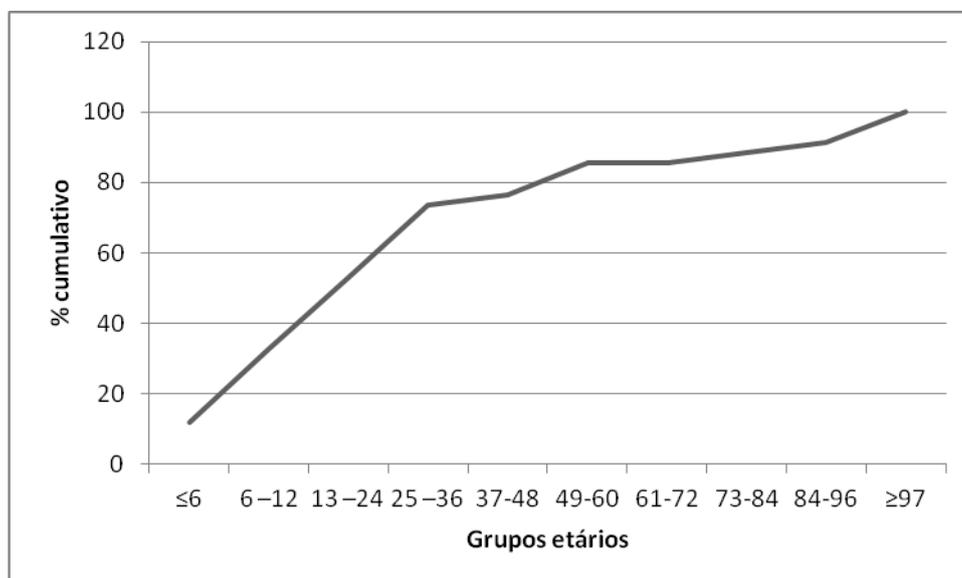


Figura 32. Percentual cumulativo da distribuição dos grupos etários das crianças que apresentaram espécimes clínicos positivos para norovírus, neste estudo, conduzido em Fortaleza, CE, de maio de 2008 a abril de 2009.

Outras manifestações clínicas, além de diarreia, relatadas pelos pacientes ou por seus acompanhantes, cujas amostras fecais indicam a presença de NoV estão demonstradas na **Tabela 7**. Dor abdominal e vômito foram as manifestações clínicas mais relatadas.

Tabela 7: Manifestações clínicas, além de diarreia, relatadas pelos pacientes com infecção por norovírus.

Manifestações Clínicas	NoV positivas	%
Vômito	24	70,6
Dor Abdominal	26	76,4
Febre ($\geq 37,5^\circ$)	20	58,8
Sangue nas fezes	8	23,5

Na **Tabela 8**, está representada a variação da carga viral, sendo que 47% das amostras analisadas neste estudo apresentaram carga viral de 5 a 6,99 \log_{10} por grama de material fecal.

Tabela 8: Quantificação da carga viral de norovírus nas amostras coletadas em Fortaleza, CE de maio de 2008 a abril de 2009

Carga viral	
em log₁₀/g de material fecal	%(n/total)
3-4,99	32(11/34)
5-6,99	47(16/34)
7-8,99	21(7/34)

5.3.1 Caracterização molecular dos norovírus detectados em Fortaleza, Ceará

Dentre as amostras positivas para infecção por NoV (n=34) pela técnica de PCR em tempo real, foi possível amplificar e sequenciar o gene que codifica o capsídeo viral (região D) de 31 amostras (91%) com a finalidade de genotipagem (**Figura 33**).

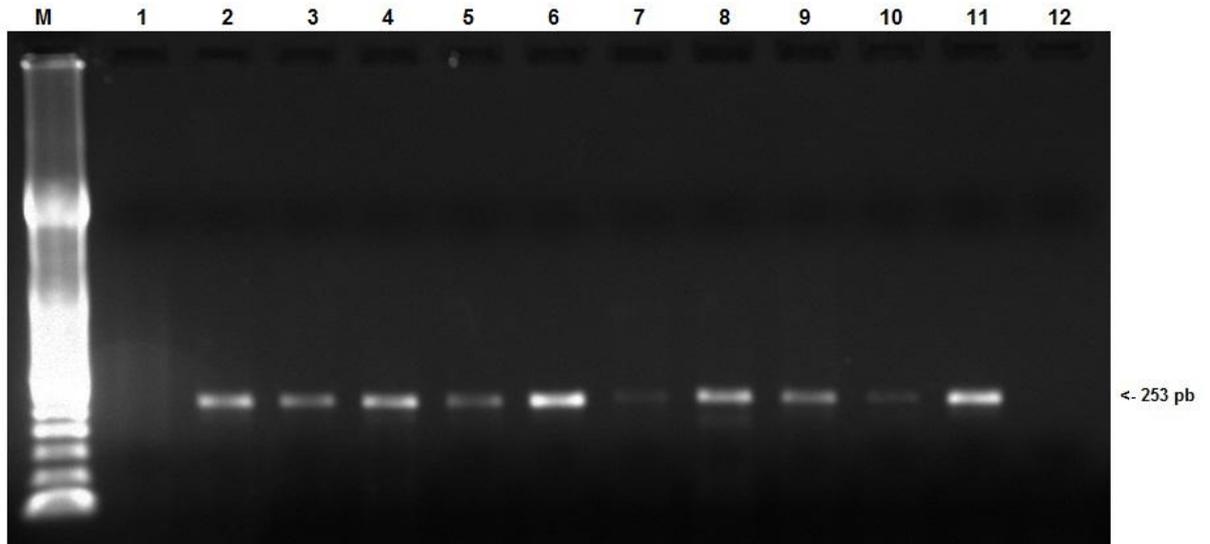


Figura 33. Eletroforese da reação de amplificação da região D do norovírus. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos de RT-PCR da região que codifica o gene do capsídeo (região D) dos norovírus detectados em Fortaleza, Ceará, de maio de 2008 a abril de 2009. M: marcador de tamanho molecular de 50 pb (Invitrogen® Corporation). Linhas 2 a 9: amostras cearenses positivas para norovírus, linha 12: controle negativo.

5.3.2 Genotipagem dos norovírus detectados em Fortaleza, Ceará

No total, 93 sequências nucleotídicas foram editadas e analisadas e possibilitaram a genotipagem de 31 das 34 amostras positivas. Três amostras não puderam ser sequenciadas pela técnica empregada, porém tais amostras foram caracterizadas como GII pela PCR em tempo real, utilizada para triagem das amostras positivas para NoV, sendo aqui denominadas GII.?. A **Figura 34** dispõem o percentual de distribuição destes genótipos: GII.4 (59%, 20/34), GII.12 (17%, 6/34), GII.6 (9%, 3/34), GII.3 (6%, 2/24) e GII.? (9%, 3/34).

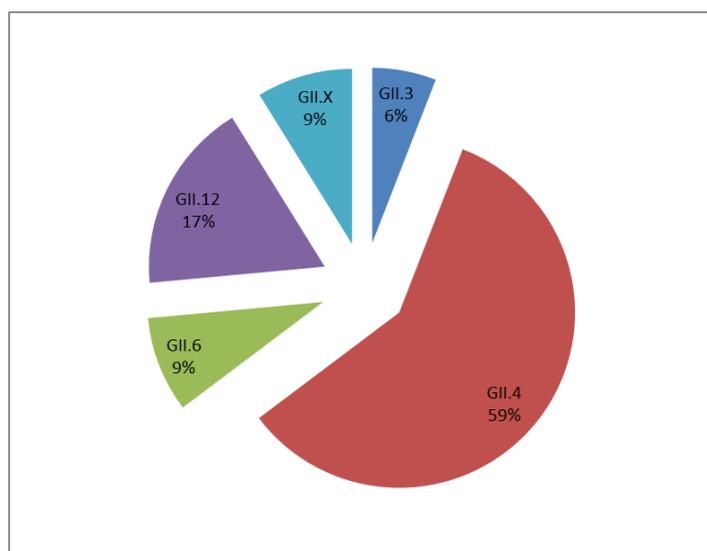


Figura 34. Distribuição genotípica dos norovírus detectados em Fortaleza, CE, no período de maio de 2008 a abril de 2009.

Amostras positivas para NoV foram detectadas durante todo o período do estudo. Índices mais elevados de detecção ocorreram nos meses de junho de 2008 e março de 2009. A **Figura 35** apresenta a distribuição anual dos casos de GA causados por NoV, estratificada por genótipos encontrados na população estudada. Nos meses de maio a outubro de 2008, GII.4 foi o único genótipo encontrado. A partir de novembro de 2008, os genótipos GII.3, GII.6 e GII.12 foram detectados.

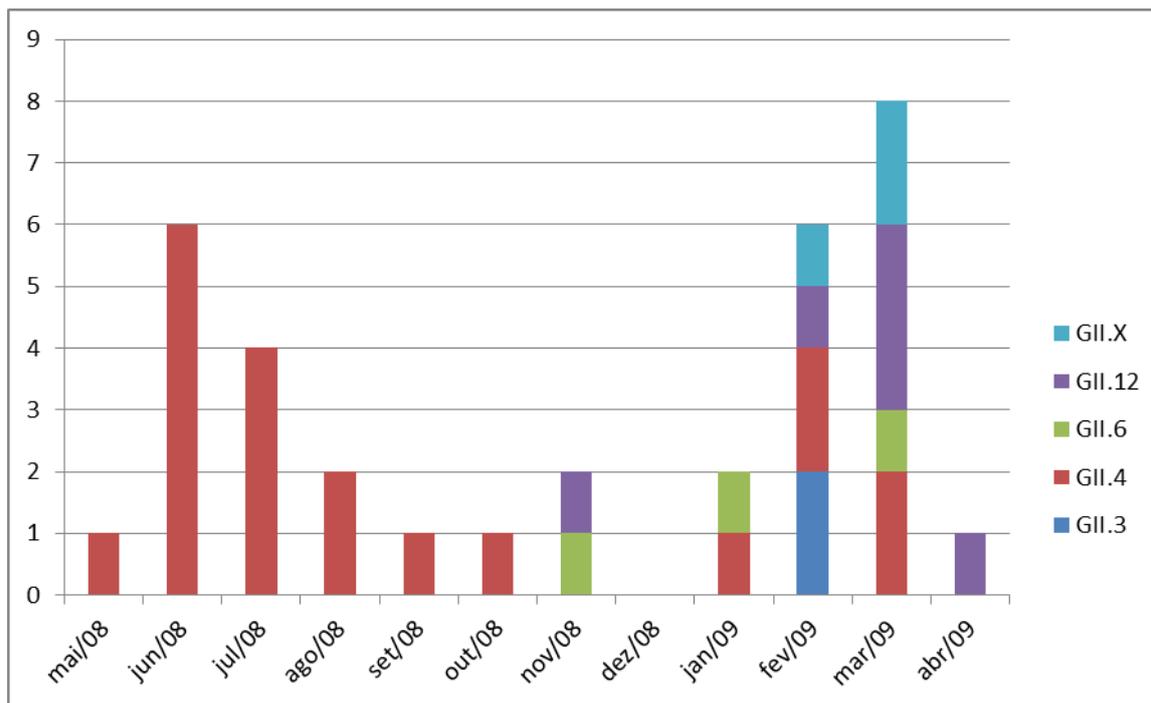


Figura 35: Distribuição anual dos casos de infecção por norovírus e estratificação dos genótipos detectados em Fortaleza, Ceará, no período de maio de 2008 a abril de 2009.

5.3.3 Análise Filogenética das amostras positivas para norovírus

A árvore filogenética baseada nas sequências nucleotídicas da Região D, que codifica a proteína VP1 de NoV está representada na **Figura 36**. As vinte amostras GII.4 agruparam-se em *clusters* de duas variantes de NoV conhecidas como: 2006a e 2006b. No *cluster* 2006a, quinze amostras deste estudo foram agrupadas com amostras dos estados do Maranhão, Alagoas, Rio Grande do Norte, Bahia e Ceará de 2008 ou de 2009. Também compõem este *cluster* amostras provenientes dos Estados Unidos, Austrália, Egito, Holanda, Rússia e África do Sul de 2006 a 2008.

O *cluster* 2006b engloba as cinco amostras GII.4 restantes (25%), que demonstraram estreita relação genética com outras amostras brasileiras (Alagoas, Bahia, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul) e amostras protótipo da Holanda e Austrália.

As duas amostras GII.3 detectadas no presente estudo foram coletadas no ano de 2009. A árvore filogenética gerada a partir da análise das sequências da região D mostrou que tais amostras, assim como amostras do

Rio de Janeiro e da Alemanha e Rússia isoladas em 2009 e 2010, formaram um *cluster* separado da amostra protótipo Toronto, isolada no Canadá, no ano 2000.

Amostras GII.12 foram detectadas no final de 2008 e início de 2009, representando um percentual de 17% (6/34). A amostra 18761, coletada no final de 2008, encontra-se num ramo separado do *cluster* das demais, que agruparam com amostras brasileiras (Rio Grande do Sul e Sergipe) e de outros países como Estados Unidos e Austrália, isoladas nos anos 2009 e 2010.

Três amostras deste estudo foram caracterizadas como GII.6. Estas amostras apresentaram estreita relação genética com amostras que circularam no Nordeste (Pernambuco), no Sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro) e Sul (Rio Grande do Sul) em 2007 e 2008. Adicionalmente, estas foram agrupadas com amostras provenientes do Japão.

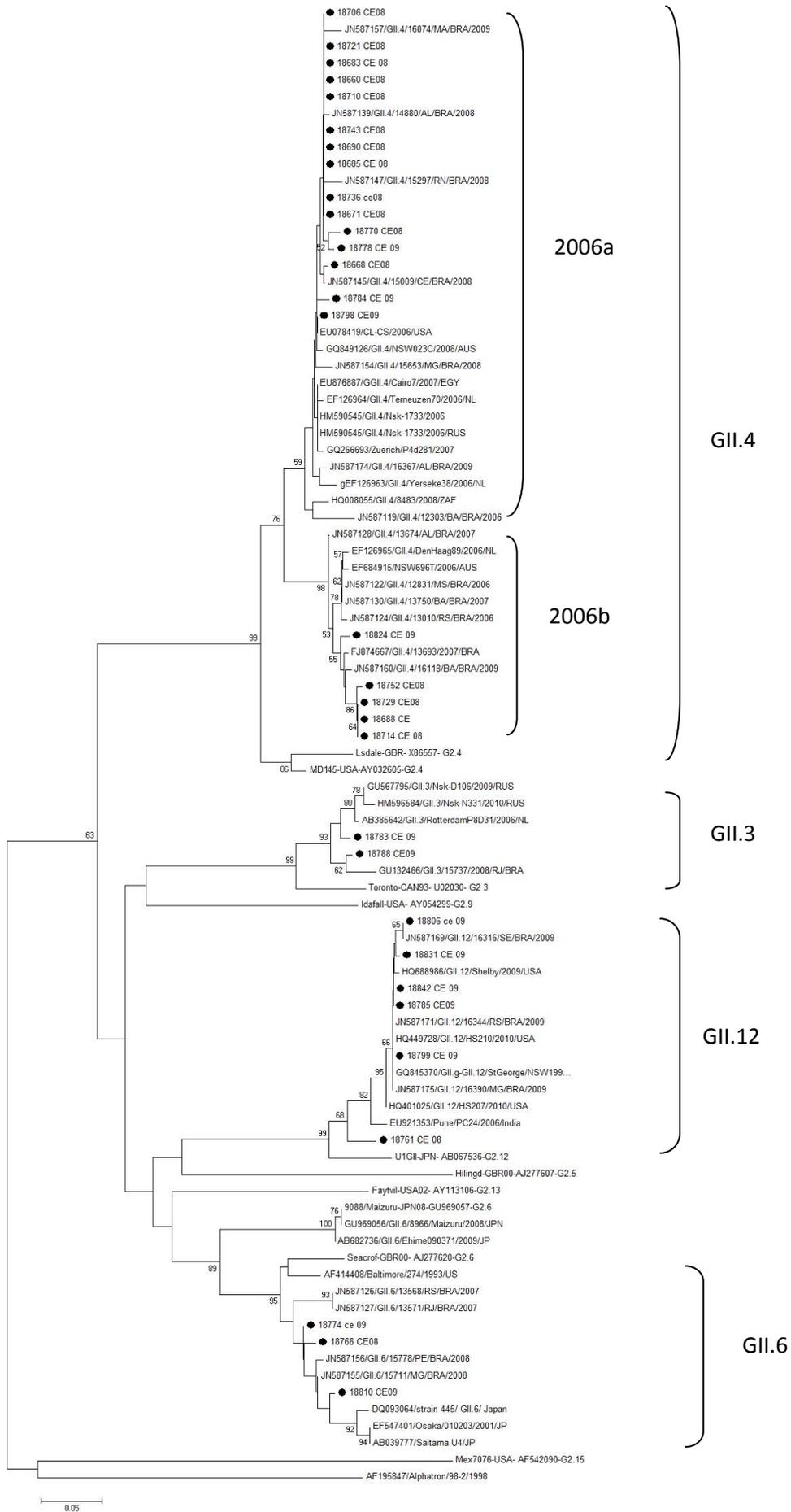


Figura 36. Árvore filogenética baseada nas sequências nucleotídicas da região D, que codifica o capsídeo de norovírus, com sequências de amostras coletadas em Fortaleza, CE, de maio de 2008 a abril de 2009 (círculo preenchido), do banco de dados *GenBank* (número de acesso ao lado) e prototípos de cada genótipo. A barra de escala na parte inferior da figura indica distância genética entre os grupos. Valores de bootstrap (2.000 replicas) estão indicados na árvore filogenética, valores inferiores a 50% não foram mostrados.

6. Discussão

No estado do Ceará, a GA é uma das causas mais importantes de morbidade e mortalidade em crianças menores de 5 anos de idade, segundo Indicadores e Dados Básicos do Ministério da Saúde (2010). A Secretaria de Saúde deste estado tem como um de seus objetivos reduzir a mortalidade infantil, que é maior que a média nacional (Secretaria Estadual de Saúde do Ceará, 2012). Neste contexto, a vigilância dos agentes etiológicos das GA é considerada essencial para o desenvolvimento de medidas de prevenção e o controle de possíveis surtos.

Com esta motivação, estudos de vigilância epidemiológica de RVA e NoV foram conduzidos a partir de amostras clínicas provenientes de casos de GA, no Estado do Ceará, entre maio de 2008 e abril de 2009.

6.1 Prevalência e perfil genotípico de rotavírus da espécie A em Fortaleza, Ceará

Inicialmente, foi realizada pesquisa e genotipagem de RVA, demonstrando prevalência de 12% e absoluta predominância (100%) do genótipo G2P[4]. Este é o primeiro relato de um estudo como este no estado do Ceará e corrobora a prevalência de RVA descrita nas regiões Norte e Nordeste, no período de 2008 a 2009: *i*) 11% em salas de emergência de Aracaju, Sergipe (Gurgel *et al.*, 2009); *ii*) 15% em crianças hospitalizadas de Recife, Pernambuco (Nakagomi *et al.*, 2008a); *iii*) 12,45% em crianças hospitalizadas de Paraupébas, Pará (Mascarenhas *et al.*, 2010). A distribuição epidemiológica de RVA foi avaliada em 18 estados brasileiros, determinando índices de detecção de 27,7% e 17,9% em 2008 e 2009, respectivamente (Carvalho-Costa *et al.*, 2011).

Apesar de este ser o primeiro estudo epidemiológico de RVA no estado do Ceará e, por este motivo, não haver informações anteriores para efeito comparativo, os dados aqui apresentados estão no contexto de tendência nacional (do Carmo *et al.*, 2011) e até mundial (Chandran *et al.*, 2010) de redução de visitas às salas de emergência e hospitalizações decorrentes de infecções por RVA, posteriormente à implementação das vacinas anti-RVA em

diversos países, incluindo o Brasil, que implementou o uso da vacina Rotarix[®] em março de 2006.

Alguns estudos realizados no Nordeste brasileiro, especificamente nas cidades de Aracaju e Recife, também demonstraram a predominância do genótipo G2P[4] no período após a introdução de Rotarix[®] pelo PNI (Gurgel *et al.*, 2007; 2009 e Nakagomi *et al.*, 2008a). Os autores destes trabalhos sugeriram que o uso da vacina Rotarix[®] teria gerado uma pressão seletiva que favoreceu o aumento do genótipo G2P[4] entre os demais circulantes. Entretanto, estes trabalhos apresentaram reduzido número de amostras, curto período de avaliação epidemiológica e baixa cobertura vacinal da região.

Carvalho-Costa e colaboradores (2009, 2011) apresentaram evidências do fenômeno da re-emergência do mesmo genótipo, mostrando que a circulação inicial no Brasil ocorreu em 2005 nos estados do Mato Grosso do Sul e Acre, que fazem fronteira com Bolívia, Paraguai e Peru, países que já relatavam altos índices de detecção deste genótipo em 2004-2005, mesmo sem a implementação da vacina em campanha nacional. Além disso, estes autores demonstraram que, de 2006 a 2008, a prevalência de G2P[4] atingiu 85%. Porém, este valor declinou para 37,5% em 2009. Com base nesses dados, os autores reforçam a hipótese de que este fenômeno está relacionado à flutuação natural deste genótipo, ocorrendo independentemente da vacinação e sugerem que a sua introdução no país ocorreu pela região Oeste, em 2005, dissipando-se praticamente por todo o território nacional, de forma muito rápida.

Neste contexto, a predominância do genótipo G2P[4] encontrada em Fortaleza de 2008 a 2009, possivelmente, reflete o fenômeno continental da re-emergência de G2P[4], relatado em diversos países da América Latina, mesmo os que não introduziram a vacinação com Rotarix[®] em suas campanhas: Honduras (Ferrera *et al.*, 2007), Paraguai (Amarilla *et al.*, 2007), El Salvador e Guatemala (Patel *et al.*, 2008). Estudos epidemiológicos na Argentina mostram que a prevalência deste genótipo aumentou de 20%, em 2004, para 44%, em 2007, e comprovam que a re-emergência de G2P[4] ocorreu independentemente da implementação da vacina (Esteban *et al.*, 2010). Além destes países, a Nicarágua apresentou predomínio na detecção deste genótipo

(88%), mesmo sendo um dos dois países da América Latina a utilizar a vacina pentavalente Rotateq[®] (Linhares *et al.*, 2011). Casos como este indicam que este genótipo pode predominar em várias regiões, independentemente do uso da vacina monovalente (Rotarix[®]) ou pentavalente (Rotateq[®]) (Linhares *et al.*, 2011).

A possibilidade de um menor efeito protetor de Rotarix[®] contra estirpes G2P[4] permanece inconclusiva atualmente. Contudo, informações recentes de estudos conduzidos em segmentos populacionais de baixo poder aquisitivo, no Brasil e na Austrália, sugerem que a efetividade protetora da vacina sofre declínio depois de um ano que foi administrada. Além disso, este fenômeno pode ser ainda mais notável para estirpes G2 de RVA (O’Ryan *et al.*, 2011).

Dados recentes de vigilância epidemiológica de RVA indicam que o genótipo G2P[4] tende a predominar no contexto de baixa prevalência de infecções por RVA e em áreas de elevada cobertura vacinal (O’Ryan *et al.*, 2011). Em Fortaleza, a cobertura vacinal no período 2008-2009 foi de 89,7% (Ministério da saúde, 2010), corroborando a tendência de predominância de G2P[4].

6.1.1 Variabilidade genômica dos RVA detectados em Fortaleza, Ceará

A variabilidade genômica dos RVA é representada pelo acúmulo de mutações pontuais (*drift* genético) e por mudanças repentinas no genoma destes vírus (*shift* genético), que, na maioria das vezes, implica em eventos de *reassortment* (Estes & Kapikian, 2007). O aumento do número de sequências nucleotídicas de RVA disponíveis nos bancos de dados mundialmente conhecidos, proporcionou estudos evolutivos mais contundentes (McDonald *et al.*, 2009b). Consequentemente, o número de trabalhos que demonstram eventos de *reassortment* aumentou sensivelmente (Matthijnssens *et al.*, 2008, 2010, 2011; McDonald *et al.*, 2009a e b; Gómez *et al.*, 2010, 2011; Bányai *et al.*, 2011).

Análise filogenética baseada nas sequências nucleotídicas dos genes que codificam para as proteínas VP4, VP7 e NSP4 revelou que pelo menos quatro variantes genéticas de RVA G2P[4] circularam em Fortaleza, Ceará

entre 2008 e 2009 (Tabela 5). Apesar das amostras cearenses apresentarem constelação gênica consensual, G2-P[4]-E2, diferentes eventos de *reassortment* foram evidenciados entre as variantes que compõem os clusters de A (A1, A2 e A3) e B. (Figuras 24, 26 e 28). Todas as amostras do estado do Ceará positivas para RVA pertencem às linhagens V e II, para genes que codificam VP4 (VP8*) e VP7, respectivamente (Figuras 24 e 26).

A reconstrução filogenética baseada nas sequências nucleotídicas do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*) mostraram que as sequências obtidas de todas as amostras isoladas em Fortaleza, no ano de 2008 (n=20), foram agrupadas com sequências de outros estados brasileiros, Coréia do Sul, Tailândia e Estados Unidos (Figura 24, *cluster A*) (Min *et al.*, 2004; Khamrin *et al.*, 2010; Mascarenhas *et al.*, 2010; Bányai *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2011). Entretanto, na análise filogenética baseada nas sequências dos genes que codificam para as proteínas VP7 e NSP4, sequências das mesmas amostras foram separadas em três *clusters* monofiléticos, A1, A2 e A3. (Figuras 26 e 28). Estes resultados sugerem que ocorreram eventos de *reassortment*. O mais provável é que os RVA de genótipo G2P[4], que circularam em Fortaleza em 2008 (*cluster A*), adquiriram o gene de VP4 (P[4]) de estirpes descritas por Gómez e colaboradores (2011) já em circulação no Brasil desde 2005. A combinação genética adquirida por estas estirpes foram selecionadas positivamente na população brasileira, possivelmente, por fatores de: antigenicidade, *fitness* da progênie viral, infecciosidade e virulência (Gómez *et al.*, 2011).

Além disso, a sequência nucleotídica da amostra 18773 de 2009, que está agrupada com as demais amostras positivas para RVA coletadas em 2009, no *cluster B* dos genes que codificam para as proteínas VP4 e NSP4, compõe o *cluster A2* do gene que codifica para a proteína VP7, com demais amostras coletadas em 2008. Isto indica que, possivelmente, ocorreu um *shift* do gene que codifica para a proteína VP7 entre a variante que circulou na cidade de Fortaleza em 2008 e a outra de 2009. São necessários estudos de epidemiologia molecular de RVA, com mais espécimes clínicos de GA isolados em Fortaleza no ano de 2009, para elucidar esta questão.

Algumas sequências nucleotídicas de amostras que se encontram no *cluster A1* do gene que codifica para a proteína VP7 foram agrupadas no

cluster A2 de NSP4, enquanto que, outras sequências pertencentes ao *cluster* A2 de VP7 foram agrupadas ao *cluster* A1 de NSP4 (Figuras 26 e 28). Esta informação sugere que os RVA de genótipo G2P[4] destas amostras, coletadas em 2008, também advêm de eventos de *reassortment* entre amostras humanas.

As sequências nucleotídicas que compõem o *cluster* B, na árvore filogenética baseada na análise do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*), agruparam com amostras do Norte e Sudeste do Brasil, exclusivamente, com sequências de 2008 e 2009. O mesmo foi observado nas árvores filogenéticas baseadas nos demais genes de RVA analisados neste trabalho. Um estudo realizado por Gómez e colaboradores (2011) demonstrou a introdução de uma variante gênica do genótipo G2P[4] na região Sudeste em 2008. Os dados do presente trabalho demonstram que esta variante também circulou nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, já que no *cluster* B foram agrupadas sequências de amostras do Sudeste, do Ceará e uma amostra isolada em Parauebas, Pará (Mascarenhas *et al.*, 2010).

Na análise filogenética baseada no gene que codifica para a proteína NSP4, as amostras componentes do *cluster* B apresentam estreita relação genética com a amostra de RVA 10.733, cujo genótipo é G6P[3], de origem bovina, isolada na Itália em 2001 (Martella *et al.*, 2003). Por outro lado, quando realizada a análise parcial da região codificante (dados não apresentados), as amostras em estudo mostraram uma relação genética próxima com uma amostra da Hungria (G6P[14]) isolada em 2003 (Bányai *et al.*, 2009), apresentando identidade nucleotídica de 0.97. Estes resultados corroboram a hipótese de Matthijnssens e colaboradores (2008) de que a origem de cepas humanas e bovinas DS-1 *like* é comum. Gómez e colaboradores (2011) obtiveram o mesmo resultado para a variante 2008-2009, a qual as amostras do Estado do Ceará de 2009, provavelmente, fazem parte. As análises filogenéticas dos genes que codificam para VP4 e VP7 sugerem que esta variante foi introduzida no Brasil recentemente, embora o evento de *reassortment* bovino-humano, provavelmente, teria ocorrido anteriormente à introdução da variante na população brasileira (Gómez *et al.*, 2011).

A análise do alinhamento de aa revelou substituições em diferentes regiões de VP4 (VP8*) quando as sequências são comparadas a da amostra protótipo DS-1. Uma destas, na posição 120, ocorreu em um dos três sítios antigênicos (Kovacs-Nolan *et al.*, 2003) (Figura 25). Esta substituição foi observada em todas as amostras pertencentes à linhagem V. As sequências do presente estudo, agrupadas no *cluster* A da análise filogenética do gene que codifica para a proteína VP4 (VP8*), mostraram substituição aminoacídica diferencial nas posições 130 e 147. Estas substituições foram descritas em estudos prévios com espécimes clínicos coletados de 2005 a 2009 no Brasil (Mascarenhas *et al.*, 2010; Gómez *et al.*, 2011). Além disso, todas as sequências que agruparam no *cluster* B mostraram substituições aminoacídicas nas posições 130, 162 e 279. A substituição na posição 162 foi compartilhada por amostras brasileiras e russas (HQ738610, CG117016), coletadas no mesmo período (Mascarenhas *et al.*, 2010; Gómez *et al.*, 2011).

Todas as amostras do Estado do Ceará, analisadas neste estudo, apresentaram substituições de aa nas posições 32^{S→N}, 89^{N→D}, 99^{N→S}, 133^{N→S}, 149^{G→S}, 160^{S→N} e 230^{S→R} (Figura 25). Análises prévias determinaram que os aa 87-89 e 148-150 são associados a neutralização cruzada limitada, enquanto que resíduos nas posições 100, 114-135 e 173-188 representam sítios de neutralização tipo-específica de VP8* (Ludert *et al.*, 1998).

Comparando as sequências de aa de VP7 das amostras cearenses com as da amostra protótipo DS-1, três substituições foram observadas em dois sítios antigênicos previamente descritos: 87, 95 (região A) e 213 (região C) (Figura 27) (Kirkwood *et al.*, 1993). Algumas dessas substituições foram encontradas não apenas nas sequências das amostras do presente estudo, mas também na maioria das que estão disponíveis em banco de dados. A substituição aminoacídica da posição 95 foi anteriormente associada a um surto de RVA G2P[4] que ocorreu em Taiwan em 1993 (Zao *et al.*, 1999). Outros trabalhos também relatam esta substituição, sugerindo que esta mudança foi selecionada e mantida no gene de VP7 das variantes de genótipo G2P[4] (Han *et al.*, 2010; Gómez *et al.*, 2011; Pietsch *et al.*, 2011).

Substituições aminoacídicas diferenciais foram observadas nas sequências das amostras pertencentes ao *cluster* A pela análise parcial do

gene de VP7 nas posições 49 e 66 (Figura 27). A substituição na posição 49 foi descrita em espécimes clínicos de um surto de GA em um dos abrigos aos refugiados das vítimas de um tsunami na Índia em 2005 (Sugunan *et al.*, 2007).

As mudanças aminoacídicas em VP4 (VP8*) e VP7 encontradas neste estudo também foram observadas na maioria das sequências de amostras brasileiras (Gómez *et al.*, 2011) e nas sequências disponíveis no banco de dados do *GenBank*, sugerindo que essas substituições tornaram-se comuns na população como produto da seleção positiva, possivelmente, proporcionando vantagem evolutiva ao vírus. Entretanto, para chegar a essa conclusão de forma mais contundente, é necessário aumentar a investigação da ocorrência dessas mutações para avançar no conhecimento da evolução dos RVA e para determinar a relação dessas mutações com a eficácia vacinal.

O alinhamento de aa da proteína NSP4 revelou a ocorrência de substituições de aa nos três sítios antigênicos (Borgan *et al.*, 2003), e na região variável inter-espécie (aa 135 – 141) (Mohan & Atreya, 2000) (Figura 29). Algumas substituições estão localizadas no domínio citoplasmático da proteína, onde estão os sítios de união de VP4 a VP6, durante a biossíntese viral (Taylor & Bellamy, 2003).

As amostras no *cluster* B da NSP4 (Figura 28) apresentaram uma mudança de aa no domínio da enterotoxina na posição 135^{M→V}, sendo esta substituição compartilhada com a amostra da Hungria (G6P[14]) isolada em 2003 (Bányai *et al.*, 2009). Dentre as amostras protótipo, esta substituição foi descrita somente em amostra detectada em murino (Horie *et al.*, 1997).

Estes dados mostram a importância de se monitorar os genótipos de RVA que circulam tanto nas populações humanas, quanto nos animais. Principalmente aqueles animais com os quais a população tem um contato mais próximo.

Os resultados observados neste estudo demonstram o grau de variabilidade genética apresentada pelos RVA em apenas um ano de vigilância epidemiológica em Fortaleza, Ceará, ainda que pertençam ao mesmo genótipo. Os RVA, como a imensa maioria dos vírus de RNA, apresentam elevada taxa de variação genética, que, no decorrer do tempo, pode distanciar-se geneticamente cada vez mais das amostras protótipos e dos padrões já conhecidos. Uma vez que o novo sistema de classificação proposto por Matthinjssens e colaboradores (2008) baseia-se nos diferentes protótipos,

espera-se que novos genótipos e/ou novas linhagens e sub-linhagens sejam descritos mais frequentemente.

Como observado em diferentes estudos, este trabalho mostrou a segregação independente dos genes que codificam para VP4, VP7 e NSP4. Os dados revelam que a variabilidade dos RVA encontrados em Fortaleza está diretamente associada à ocorrência de mutações pontuais e *reassortment*, tanto entre amostras humanas quanto entre amostras humanas e bovinas (McDonald *et al.*, 2009 a e b; Gómez *et al.*, 2010, 2011; Bányai *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011).

Pela análise filogenética conduzida neste estudo, percebe-se que as amostras que circularam em Fortaleza no período de maio de 2008 a abril de 2009 não formaram um grupo monofilético, mas apresentaram relação filogenética próxima com amostras que circularam em diferentes regiões do mundo e que foram detectadas em diferentes anos. Este padrão filogenético indica o fluxo global de variantes virais, sugerindo a entrada e saída de variantes de RVA genótipo G2P[4] em Fortaleza, Ceará.

A diversidade de estirpes selvagens de RVA circulando no mundo é cada vez maior, com flutuações anuais entre as estirpes dominantes. Ambas vacinas contra RVA (Rotateq[®] e Rotarix[®]) demonstraram efeito protetor contra doenças causadas pelos genótipos mais prevalentes mundialmente (de Palma *et al.*, 2010; Justino *et al.*, 2011; Steele *et al.*, 2011; Kawamura *et al.*, 2011), mas a proteção contra as estirpes novas e emergentes ainda será definida. A natureza dos RVA mostra-se altamente capaz de evoluir rapidamente por acúmulo de mutações pontuais, que proporcionam mudanças antigênicas ou a emergência de novas variantes, possivelmente por eventos de *reassortment* entre RVA detectados em animais e humanos. Não se sabe até que ponto a pressão seletiva induzida pela implementação de vacinas podem aumentar a ocorrência desses eventos, já que novas variantes podem emergir com diferentes combinações de VP4 e VP7 para a qual a vacina pode não oferecer proteção (Kirkwood, 2010).

6.2 Prevalência e perfil genotípico de norovírus em Fortaleza, Ceará

O primeiro trabalho científico a avaliar a epidemiologia molecular da GA por NoV, no Brasil, foi conduzido em Fortaleza por Parks e colaboradores (1999). Em um surto, foram identificadas cinco amostras pertencentes ao genogrupo I e três, ao genogrupo II. Essa diversidade entre indivíduos da mesma comunidade indicou múltiplos focos de infecção.

A região de junção das ORFs 1 e 2 apresenta-se como a mais conservada do genoma dos NoV, com marcante identidade nucleotídica dentre as diferentes estirpes do mesmo genogrupo. (Katayama *et al.*, 2002 e Kageyama *et al.*, 2003). Essa característica torna esta região ideal para o desenho de oligonucleotídios iniciadores e sondas para ensaios de amplificação genômica para quantificação e para detecção (PCR em tempo real), como foi executado neste trabalho. Esta metodologia propiciou a detecção de 34 amostras positivas (17%) e a distinção de genogrupos, sendo o GII exclusivamente encontrado.

Cinco diferentes regiões (A-E) do genoma são utilizadas para genotipagem destes vírus (Ando *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1995; Noel *et al.*, 1997; Vinjé *et al.*, 2004; Kojima *et al.*, 2002; Vennema *et al.*, 2002). Entretanto, métodos baseados nas regiões do gene que codifica para a proteína do capsídeo (regiões C e D), permitem melhor distinção entre os genótipos (Vinjé *et al.*, 2004; CDC, 2011a). Apesar da região C ser amplamente utilizada para genotipagem de NoV em espécimes clínicos em laboratórios dos Estados Unidos, Europa e Japão, o potencial de discernimento entre diferentes variantes do genótipo GII.4, por exemplo, é inferior ao da região D (CDC, 2011a). Por este motivo, as amostras deste trabalho foram genotipadas baseando-se na região D. Dessa forma, as infecções por NoV aqui detectadas foram associadas aos genótipos GII.4 (59%), GII.12 (17%), GII.6 (9%), GII.? (9%) e GII. 3 (6%), revelando grande diversidade genotípica de NoV no período estudado.

O avanço e a maior disponibilidade de técnicas moleculares de diagnóstico possibilitaram o reconhecimento do papel dos NoV como principal

causa de GA esporádicas em todas as faixas etárias. Os casos de infecção esporádica, por este vírus, foram avaliados em 31 estudos epidemiológicos desenvolvidos tanto em ambientes hospitalares (salas de atendimento de emergência), quanto em comunidades de países desenvolvidos e em desenvolvimento, revelando sua prevalência de 10 a 15% entre pacientes de todas as idades (Patel *et al.*, 2008).

A diversidade genética dos NoV ocorre devido ao acúmulo de mutações pontuais associadas às combinações genéticas relacionadas com a troca de sequências entre NoV similares. Isto ocorre pela natureza da RNA polimerase dos vírus, que não possui atividade *proofreading* durante a replicação do genoma (Glass *et al.*, 2009). A indefinição de genótipos de algumas amostras, aqui designadas como GII.?, pode estar relacionada à alta variabilidade genética da Região D, e consequente não hibridização do material genético das amostras com os oligonucleotídeos iniciadores de PCR utilizados, em virtude de mutações pontuais, algo que é comumente relatado para os NoV (Victoria *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008, 2010; Dinatale, 2011). Mattinson e colaboradores (2007) sugeriram a utilização da região C para caracterização genotípica e da região D para caracterização de variantes genéticas de GII.4. Certamente, a caracterização molecular de NoV necessita de novos protocolos que permitam a ampliação do conhecimento sobre novas variantes e a real distribuição genotípica de NoV.

Vários estudos têm demonstrado que o genótipo GII.4 está associado a maioria dos surtos e casos de GA esporádicos no mundo (Bull *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2010; CDC, 2011 a e b; Motomura *et al.*, 2008; Siebenga *et al.*, 2009). Desde meados de 1990, este genótipo é responsável por 70-80% dos surtos de NoV ocorridos no mundo, principalmente, devido à emergência de quatro variantes: 2002, 2004, 2006a e 2006b (Siebenga *et al.*, 2009).

Neste estudo, GII.4 foi o único genótipo detectado de maio a outubro de 2008, e o mais prevalente durante todo o período de avaliação (59%). Esses resultados condizem com estudos previamente publicados em diferentes países (Victoria *et al.*, 2007; Siebenga *et al.*, 2009; Pang *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010; Ouyang *et al.*, 2012). Recentemente, no Brasil, foi desempenhada

avaliação epidemiológica, por Fioretti e colaboradores (2011), pelo período de 4 anos, demonstrando 78% de prevalência do genótipo GII.4 e este foi encontrado em nove dos 13 estados estudados.

O fenômeno da alta prevalência mundial de GII.4, que entre 2002 e 2006 teve praticamente uma nova variante emergindo por estação de inverno nos países do Hemisfério Norte, apresenta três possíveis explicações: *i*) variantes que emergiram podem diferir quanto à afinidade por ligantes do hospedeiro na etapa de adsorção celular; *ii*) os NoV deste genótipo efetuaram introdução eficiente, considerando que surtos de larga escala, ampla difusão e associados à contaminação alimentar ocorreram no inverno de 2000-2001 em vários países da Europa e subsequente transmissão viral para outras regiões do mundo ano após ano (Siebenga *et al.*, 2009; Lidesmith *et al.*, 2008).

No que concerne à origem geográfica da emergência de novas variantes de GII.4, Siebenga e colaboradores (2009) observaram indícios de um padrão de emergência em que o primeiro relato de surto ocasionado por variantes de alto-impacto global ocorreu na Ásia e subsequentemente o segundo continente afetado foi a Oceania. Esta evidência confirmou-se nas ondas de emergência de 3 das 4 variantes de GII.4 conhecidas mundialmente.

No período de avaliação epidemiológica do presente estudo, foram encontradas duas variantes de GII.4 circulando simultaneamente: 2006a e b. Das 20 amostras pertencentes ao GII.4, 15 foram agrupadas no *cluster* da variante 2006a, e apenas 5 no *cluster* 2006b. Motomura e colaboradores (2008) realizaram análise filogenética do genoma completo de ambas variantes e concluíram que estas apresentam um ancestral comum, que circulou em algumas cidades japonesas no início de 2006. Mesmo após a diferenciação, estas variantes ainda coexistem, mas com dominância genética de 2006b (Motomura *et al.*, 2008).

O segundo genótipo mais encontrado neste estudo foi GII.12 (17%). Segundo dados da literatura, os NoV recombinantes de genótipo GII.12 emergiram em 2008, na Austrália e, depois disso, foram descritos circulando nos Estados Unidos, na Itália e também responsáveis por surtos alimentares, na maioria das vezes associados ao consumo de ostras, na Nova Zelândia, na

França, Hungria e Suécia no inverno de 2009-2010 (Eden *et al.*, 2010; Mahar & Kirkwood, 2011; Vega & Vinjé, 2011; Giammanco *et al.*, 2012). Os pontos de recombinação foram demarcados adjacentes à junção das ORFs 1 e 2 (Mahar & Kirkwood, 2011). Os NoV deste genótipo detectados na Itália demonstraram grande polimorfismo e maior taxa evolutiva, quando comparados aos NoV de genótipo GII.4 (Giammanco *et al.*, 2012). Por este motivo, a vigilância epidemiológica deste genótipo torna-se extremamente importante para a saúde pública, já que este atingiu a distribuição global rapidamente.

O fenômeno de emergência de GII.12, visto também no presente estudo, em Fortaleza, talvez seja resultado do escape antigênico do efeito de imunidade coletiva, já difuso na população, contra genótipos dos NoV predominantes, como o GII.4. Outra possibilidade é a adaptação eficaz aos receptores do hospedeiro, tornando a infecção por estas estirpes propícias ao sucesso (Giammanco *et al.*, 2012).

Três amostras cearenses foram agrupadas no *cluster* de GII.6, com outras de diferentes regiões brasileiras e do Japão. GII.6 também foi detectado em estudo prévios, circulando no Espírito Santo (Barreira *et al.*, 2010), no Rio de Janeiro (Ferreira *et al.*, 2010), Pernambuco e Minas Gerais (Fioretti *et al.*, 2011).

O genótipo GII.3 foi detectado, no mês de fevereiro, em 6% das amostras positivas para NoV. No Brasil, este genótipo já teve a sua circulação descrita em 85% das crianças com infecção assintomática no Espírito Santo (Barreira *et al.*, 2010), em 2005; ocasionou surto de GA no estado do Rio de Janeiro, em 2008 (Ferreira *et al.*, 2010) e na grande São Paulo, em 1999 (Castilho *et al.*, 2006). De forma mais grave, os NoV deste genótipo foram responsáveis por um surto na Austrália, ocasionando enterocolite necrotizante em 10 crianças, em 2008 (Stuart *et al.*, 2010).

Apesar do grande número de genótipos de NoV co-circulantes na população humana, genótipos específicos tendem a predominar, como o GII.3, que possui destacada importância global. Boon e colaboradores (2011) analisaram a evolução molecular deste genótipo por 31 anos e demonstraram que este causa GA desde 1975, apresenta taxa evolutiva similar a de GII.4 e

sua dinâmica evolutiva mostra-se altamente responsiva às pressões seletivas proporcionadas pelo hospedeiro.

No presente estudo, uma amostra apresentou coinfeção por NoV GII.2 e RVA G2P[4]. A carga viral de NoV encontrada nesta foi maior do que a detectada em 47% das amostras (5 a $6,99\log_{10}/g$ de material fecal). Barreira e colaboradores (2010) avaliaram a carga viral dos NoV e revelaram que a maioria das crianças sintomáticas apresentaram carga viral de 8-9,99 \log_{10}/g de fezes. Além disso, a carga viral de NoV em amostras de infecção mista com RVA foi muito menor do que a média, diferindo do que foi encontrado em Fortaleza, Ceará.

Independentemente da carga viral, a baixa dose infectante de NoV previamente descrita (Teunis *et al.*, 2008), o longo período de excreção do vírus (Rockx *et al.*, 2002), as diversas fontes de infecção (CDC, 2011a e b), a alta resistência do vírus no ambiente externo (Barker *et al.*, 2004), e diferentes variantes antigênicas emergindo com grande rapidez (Victoria *et al.*, 2009) influenciam para a transmissão deste vírus.

O presente estudo contribui para agregar conhecimento sobre a participação dos RVA e NoV neste contexto, além de disponibilizar mais informação a respeito da epidemiologia desses vírus no Brasil.

7. Conclusões

A prevalência de 12% para RVA e 17% para NoV demonstra a importância epidemiológica desses vírus, no Estado do Ceará.

Dentre as amostras positivas para RVA, apenas o genótipo G2P[4]E2 foi encontrado.

As análises filogenéticas permitiram identificar 3 variantes do gene que codifica para a proteína VP7, 2 variantes do gene que codifica a proteína VP4, 3 variantes do gene que codifica para a proteína NSP4, demonstrando a segregação independente dos genes de RV-A analisados. Em 2009, uma nova variante foi identificada.

Dos mecanismos de geração de diversidade em RVA, foi possível evidenciar a ocorrência de: *i)* mutações pontuais; *ii)* *reassortment* entre amostras humanas; *iii)* *reassortment* entre amostras humanas e amostras bovinas para o gene que codifica para a proteína NSP4.

Dentre as amostras positivas para NoV, foram detectados quatro genótipos: GII.4 (59%), GII.12 (17%), GII.6 (9%) e GII. 3 (6%), revelando grande diversidade genotípica no período de estudo: o genótipo GII.4 foi predominante, seguido do genótipo GII.12, corroborando o fenômeno de emergência deste, descrito mundialmente a partir de 2008.

8. Referências Bibliográficas

- Adler JL & Zickl R. Winter vomiting disease. *J Infect Dis.* 1969; 119:668-73.
- Amarilla A, Espínola EE, Galeano ME, *et al.* Rotavirus infection in the Paraguayan population from 2004 to 2005: high incidence of rotavirus strains with short electropherotype in children and adults. *Med Sci Monit.* 2007;13: CR333-7.
- Anderson EJ. Prevention and treatment of viral diarrhea in pediatrics. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(2):205-17.
- Ando T, Jin Q, Gentsch JR, *et al.* Epidemiologic applications of novel molecular methods to detect and differentiate small round structured viruses (Norwalk-like viruses). *J Med Virol.* 1995; 47:145-52.
- Andreasi MS, Cardoso DD, Fernandes SM, *et al.* Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103:741-4.
- Antunes H, Afonso A, Iturriza M, *et al.* G2P[4] the most prevalent rotavirus genotype in 2007 winter season in an European non-vaccinated population. *J Clin Virol.* 2009; 45(1):76-8.
- Aoki ST, Settembre EC, Trask SD, *et al.* Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science.* 2009; 324(5933):1444-7.
- Appleton H. Small round viruses: classification and role in food-borne infections. *Ciba Found Symp.* 1987; 128:108-125.
- Araujo IT., Assis RM., Fialho AM., *et al.* Brazilian P[8],G1, P[8],G5, P[8],G9, and P[4],G2 rotavirus strains: nucleotide sequence and phylogenetic analysis. *J Med Virol.* 2007; 79: 995-1001.
- Arias CF, Romero P, Alvarez V, Lopez S. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virology.* 1996; 70(9):5832-9.
- Arnold, MM & Patton, JT. Diversity of Interferon antagonist activities mediated by NSP1 proteins of different rotavirus strains. *J Virology.* 2011; 85 (5): 1970-9.
- Arnoldi F, Campagna M, Eichwald C, *et al.* Interaction of rotavirus polymerase VP1 with nonstructural protein NSP5 is stronger than that with NSP2. *J Virology.* 2007; 81(5):2128-37.
- Ball JM, Tian P, Zeng CY. Age-dependent diarrhea induced by rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science.* 1996; 272: 101-4.
- Bányai K., Bogdan,A., Domonkos,G., *et al.* Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003-2006, Hungary. *J. Med. Virol.* 2009; 81 (2): 362-70.
- Bányai K, Mijatovic-Rustempasic S, Hull JJ, *et al.* Sequencing and phylogenetic analysis of the coding region of six common rotavirus strains: evidence for intragenogroup reassortment among co-circulating G1P[8] and G2P[4] strains from the United States. *J Med Virol.* 2011; 83(3):532-9.

- Barker J, Vipond IB, Bloomfield SF. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect.* 2004; 58:42-9.
- Barreira DM, Ferreira MS, Fumian TM, Checon R, de Sadovsky AD, *et al.* Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *J Clin Virol.* 2010; 47:60-4.
- Barro M & Patton JT. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005; 102:4114-9.
- Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol.* 2003; 77:11603-15.
- Beuret C, Kohler D, Baumgartner A, Luthi TM. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68:1925-31.
- Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, *et al.* Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.* 1973; 2(7841):1281-3.
- Bishop RF, Unicomb LE, Barnes GL. Epidemiology of rotavirus serotypes in Melbourne, Australia, from 1973 to 1989. *J Clin Microbiol.* 1991; 29(5):862-8.
- Black RE, Cousens S, Johnson HL, *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet.* 2010; 375: 1969-87.
- Boom R, Sol CA, Salimans MM, Jansen CL, *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990; 28:495-503.
- Boon D, Mahar JE, Abente EJ, *et al.* Comparative evolution of GII.3 and GII.4 norovirus over a 31-year period. *J Virol.* 2011;85(17):8656-66.
- Borgan MA, Mori Y, Ito N, *et al.* Antigenic analysis of nonstructural protein (NSP) 4 of group A avian rotavirus strain PO-13. *Microbiol Immunol.* 2003; 47(9):661-8.
- Boshuizen JA, Rossen JW, Sitaram CK, *et al.* Rotavirus enterotoxin NSP4 binds to the extracellular matrix proteins laminin-beta3 and fibronectin. *J Virol* 2004; 78(18):10045-53.
- Bowman GD, Nodelman IM, Levy O, *et al.* Crystal structure of the oligomerization domain of NSP4 from rotavirus reveals a core metal-binding site. *J Mol Biol.* 2000; 304, 861-71.
- Boxman IL, Tilburg JJ, Te Loeke NA, *et al.* Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *Int J Food Microbiol.* 2006; 108:391-6.
- Bull RA, Eden JS, Rawlinson WD, White PA. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. *PLoS Pathog.* 2010; 6:e1000831.
- Campos GS, Moreau VH, Bandeira A, *et al.* Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil. *Arch Virol* 2008; 153:1125-9.
- Carlsson B, Kindberg E, Buesa J, *et al.* The G428A nonsense mutation in FUT2 provides strong but not absolute protection against symptomatic GII.4 Norovirus infection. *PLoS One.* 2009; 4:e5593.

Carvalho-Costa FA, Araújo IT, Santos de Assis RM, *et al.* Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(1):95-7.

Carvalho-Costa FA, Volotão EM, de Assis RM, *et al.* Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009. *Pediatr Infect Dis Journal.* 2011; 30(1):S35-41.

Castilho JG, Munford V, Resque HR, *et al.* Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in Sao Paulo State, Brazil. *J Clin Microbiol* 2006; 44:3947-53.

Castriciano S, Luinstra K, Petrich A, *et al.* Comparison of the RIDASCREEN norovirus enzyme immunoassay to IDEIA NLV GI/GII by testing stools also assayed by RT-PCR and electron microscopy. *J Virol Methods.* 2007; 141(2):216-9.

Caul EO & Appleton H. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. *J Med Virol.* 1987; 9:257-65.

Center for Diseases Control . CDC. Norovirus Activity: Morbidity and Mortality Weekly Report. 2003; 52:41-45.

Center for Diseases Control . CDC. Norovirus Activity: Morbidity and Mortality Weekly Report. 2011a; 47:41-45.

Center for Disease Control and Prevention, 2011b. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/gastro>. Disponível em 19/10/11, às 9h.

Chandran A, Zhen A, Santosham M. Prevention of rotavirus gastroenteritis in infants and children: rotavirus vaccine safety, efficacy, and potential impact of vaccines. *Biologics.* 2010; 9(4):213-29.

Clarke SK, Cook GT, Egglestone SI, Hall TS, Miller DL, *et al.* A virus from epidemic vomiting disease. *Br .Med J.* 1972; 3:86-9.

Clarke IN, Estes MK, Thiel HJ, *et al.* Caliciviridae. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. pp 977-986. San Diego: Elsevier, 2011.

Conner ME & Ramig, RF. Viral Enteric Diseases. In: *Viral Pathogenesis*, ed. by Neal Nathanson *et al.*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997, p 713-43.

Cook N, Bridger J, Kendall K, Gomara MI, El-Attar L, Gray J. The zoonotic potential of rotavirus. *J Infect.* 2004;48(4):289-302.

Costantini V, Grenz L, Fritzingler A, *et al.* Diagnostic accuracy and analytical sensitivity of IDEIA Norovirus assay for routine screening of human norovirus. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(8):2770-8.

Coutinho BP, Oriá RB, Lima AA, Guerrant RL *et al.* Cryptosporidium infection causes undernutrition and, conversely, weanling undernutrition intensifies infection. *J Parasitol.* 2008; 94(6):1225-32.

Daniels NA, Bergmire-Sweat DA, Schwab KJ. A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular trace back to deli sandwiches contaminated during preparation. *J Infect Dis.* 2000; 181:1467-1470.

- Das B. K., Gentsch J. R., Cicirello H. G., *et al.* Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol.* 1994; 32:1820-2.
- Davidson GP, Bishop RF, Townley RR, *et al.* Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. *Lancet.* 1975; 1(7901): 242-6.
- de Bruin E, Duizer E, Vennema H, Koopmans MP. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J Virol Methods.* 2006; 137(2): 259-64.
- De Donno A, Grassi T, Bagordo F, *et al.* Collaborative Group for the surveillance of Rotavirus Infection. Emergence of unusual human rotavirus strains in Salento, Italy, during 2006-2007. *BMC Infect Dis.* 2009; 15 (9): 43.
- de Oliveira ASL, Mascarenhas JP, Soares LS, *et al.* Reemergence of G2 rotavirus serotypes in Northern Brazil reflects a natural changing pattern over time. The 8th Rotavirus International Symposium, Istanbul, Turkey, Abstracts p. 60-61, 2008.
- de Oliveira LH, Danovaro-Holliday MC, Sanwogou NJ, *et al.* Progress in the introduction of the rotavirus vaccine in Latin America and the Caribbean: four years of accumulated experience. *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30(1 Suppl):S61-6.
- de Palma O, Cruz L, Ramos H *et al.* Effectiveness of rotavirus vaccination against childhood diarrhoea in El Salvador: case-control study. *BMJ* 2010; 340, c2825.
- Desselberger U. Genome rearrangements of rotaviruses. *Adv Virus Res.* 1996; 46: 69-95.
- Dinatale, MG. Detecção e caracterização molecular de norovírus em casos de Gastroenterite infantil aguda no Departamento Central do Paraguai. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Biologia Celular e Molecular]- Instituto Oswaldo Cruz, 2011.
- do Carmo GM, Yen C, Cortes J, *et al.* Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. *PLoS Med.* 2011 ;8(4):e1001024.
- Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Buscho RF, Wyatt RG, *et al.* 1972. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med* 140:578-583.
- Dormitzer PR, Sun ZY, Wagner G, Harrison SC. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO J.* 2002;21(5):885-97.
- Dunn SJ., Fiore L, Werner RL, *et al.* Immunogenicity, antigenicity, and protection efficacy of baculovirus expressed VP4 trypsin cleavage products, VP5(1)* and VP8* from rhesus rotavirus. *Arch Virol.* 1995; 140: 1969-78.
- Eden JS, Bull RA, Tu E, *et al.* Norovirus GII.4 variant 2006b caused epidemics of acute gastroenteritis in Australia during 2007 and 2008. *J Clin Virol.* 2010 49(4):265-71.
- El-Kamary SS, Pasetti MF, Mendelman PM, Frey SE, *et al.* Adjuvanted intranasal Norwalk virus-like particle vaccine elicits antibodies and antibody-secreting cells that express homing receptors for mucosal and peripheral lymphoid tissues. *J Infect Dis* 2010; 202:1649-1658.
- Esteban LE, Rota RP, Gentsch JR *et al.* Molecular epidemiology of group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina 2004-2007: reemergence of G2P[4] and emergence of G9P[8] strains. *J Med Virol.* 2010; 82(6):1083-93.

- Estes MK & Kapikian A Z. Rotaviruses In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. 5th edição. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2007, p1917–74.
- Fabbretti E, Afrikanova I, Vascotto F, Burrone OR. Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. J Gen Virol. 1999; 80 (2):333-9.
- Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, *et al.* Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. J Infect Dis 2002; 186:1-7.
- Ferreira MS, Xavier MP, Fumian TM, Victoria M, Oliveira SA, *et al.* Acute gastroenteritis cases associated with noroviruses infection in the state of Rio de Janeiro. J Med Virol 2008; 80:338-344
- Ferreira MS, Victoria M, Carvalho-Costa FA, Vieira CB, Xavier MP, *et al.* Surveillance of norovirus infections in the state of Rio De Janeiro, Brazil 2005-2008. J Med Virol 2010; 82:1442-1448.
- Ferrera A, Quan D, Espinoza F. Increased prevalence of genotype G2P(4) among children with rotavirus-associated gastroenteritis in Honduras. The 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ICC, Munich, Germany, 2007.
- Fioretti JM, Ferreira MS, Victoria M, *et al.* Genetic diversity of noroviruses in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(8):942-7.
- Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Letter: Virus particles in gastroenteritis. Lancet. 1973; 2(7844):1497.
- Flewett TH & Woode GN. The rotaviruses. Arch Virol. 1978; 57(1):1-23.
- Fumian TM, Leite JP, Marin VA, Miagostovich MP. A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. J Virol Methods 2009; 155:39-43.
- Gallimore CI, Barreiros MA, Brown DW, Nascimento JP, Leite JP. Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. Braz J Med Biol Res 2004; 37:321-326
- Gallimore CI, Taylor C, Gennery AR, Cant AJ, Galloway A, *et al.* Environmental monitoring for gastroenteric viruses in a pediatric primary immunodeficiency unit. J Clin Microbiol 2006; 44:395-399
- Gentsch JR., Glass R I, Woods P, *et al.* Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1992; 30, 1365-1373.
- Giammanco GM, Rotolo V, Medici MC, *et al.* Recombinant norovirus GII.g/GII.12 gastroenteritis in children. Infect Genet Evol. 2012;12(1):169-74.
- Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, *et al.* The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. J Infect Dis. 2000;181 Suppl 2:S254-261.
- Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. N Engl J Med. 2009; 361(18):1776-85.
- Gomes KA, Stupka JA, Gomez J, Parra GI. Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis in Argentina. J Med Virol 2007; 79:1703-1709.

Gómez MM. Análise filogenética dos genes que codificam as proteínas VP7, VP4, VP6 e NSP4 de rotavírus-a genótipo G2P[4] detectados no Brasil no período de 1996 a 2009. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Biologia Celular e Molecular]- Instituto Oswaldo Cruz; 2009

Gómez MM, Volotão EM, de Mendonça MC *et al.* Detection of uncommon rotavirus A strains P[8]G8 and P[4]G8 in the city of Rio de Janeiro, 2002. *J Med Virol.* 2010;82(7):1272-6.

Gómez MM, de Mendonça MC, Volotão Ede M, *et al.* Rotavirus A genotype P[4]G2: genetic diversity and reassortment events among strains circulating in Brazil between 2005 and 2009. *J Med Virol.* 2011; 83(6):1093-106.

Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, *et al.* Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep* 2005; 6:968-972.

Gouvea V, Glass RI, Woods P, *et al.* Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1990;28(2):276-82.

Graff JW, Ettayebi K., Hardy ME. Rotavirus NSP1 inhibits NFkappaB activation by inducing proteasome-dependent degradation of beta-TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism. *PLoS Pathog.* 2009; 5(1):e1000280.

Green SM, Lambden PR, Caul EO, *et al.* Capsid diversity in small round-structured viruses: molecular characterization of an antigenically distinct human enteric calicivirus. *Virus Res.* 1995;37(3):271-83.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, *et al.* Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis.* 2000; 181 Suppl 2:S322-330.

Green K. Y. Caliciviridae: The Noroviruses. In *Fields' virology* ed. PMH D. M. Knipe, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus pp. p. 949–980. Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

Greenberg HB, Valdesuso JR, Kalica AR, Wyatt RG, McAuliffe VJ, *et al.* Proteins of Norwalk virus. *J Virol.* 1981; 37:994-999.

Guerrero CA, Méndez E, Zárate S, *et al.* Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(26):14644-9.

Guix S, Asanaka M, Katayama K, Crawford SE, Neill FH, *et al.* Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *J Virol* 2007; 81:12238-48

Gurgel RQ, Cuevas LE, Vieira SC, *et al.* Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(10):1571-3.

Gurgel RG, Bohland AK, Vieira SC, Oliveira DM, *et al.* Incidence of rotavirus and all-cause diarrhea in northeast Brazil following the introduction of a national vaccination program. *Gastroenterology.* 2009; 137(6):1970-5.

Han TH, Kim CH, Chung JY, *et al.* Genetic characterization of rotavirus in children in South Korea from 2007 to 2009. *Arch Virol.* 2010 ;155(10):1663-73.

Hardy ME. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 253:1-8

- Heiman EM, McDonald SM, Barro M, *et al.* Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *J Virol.* 2008; 82(22):11106-16.
- Horie Y., Masamune O., Nakagomi O. Three major alleles of rotavirus NSP4 proteins identified by sequence analysis. *J. Gen. Virol.* 1997;78 (PT 9), 2341-2346.
- Huang H, Schroeder F, Estes MK, *et al.* Interaction(s) of rotavirus non-structural protein 4 (NSP4) C-terminal peptides with model membranes. *Biochem J.* 2004; 380: 723-33.
- Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis* 2002; 185:1335-7.
- ICTVdB Virus Code: 00.060.0.03. Virus accession number: 060003GE. Obsolete virus code: 60.0.3.; superceded accession number: 60030000. NCBI Taxon Identifier NCBI Taxonomy ID: 10912. Disponível em 28/10/11, às 14h.
- Ike AC, Brockmann SO, Hartelt K, Marschang RE, Contzen M, Oehme RM. Molecular epidemiology of norovirus in outbreaks of gastroenteritis in southwest Germany from 2001 to 2004. *J Clin Microbiol* 2006; 44:1262-7.
- Isa P, López S, Segovia L, Arias CF. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *J Virol.* 1997; 71(9):6749-56.
- Isa P, Realpe M, Romero P, *et al.* Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology.* 2004 ;322(2):370-81.
- Iturriza-Gómara M, Isherwood B, Desselberger U, Gray J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J Virol.* 2001;75(8):3696-705.
- Iturriza-Gómara M, Dallman T, Van Ranst M, *et al.* Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol Infect.* 2011; 139(6):895-909.
- James VL, Lambden PR, Deng Y, *et al.* Molecular characterization of human group C rotavirus genes 6, 7 and 9. *J Gen Virol.* 1999;80 (12):3181-7.
- Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 1992; 66:6527-32.
- Jiang X, Turf E, Hu J, Barrett E, *et al.* Outbreaks of gastroenteritis in elderly nursing homes and retirement facilities associated with human caliciviruses. *J Med Virol.* 1996; 50(4):335-41.
- Johansen K, Hinkula J, Espinoza F, *et al.* Humoral and cell-mediated immune responses in humans to the NSP4 enterotoxin of rotavirus. *J Med Virol.* 1999; 59(3), 369-77.
- Jones EL, Kramer A, Gaither M, Gerba CP. Role of fomite contamination during an outbreak of norovirus on houseboats. *Int J Environ Health Res.* 2007;17(2):123-31.
- Justino MCA, Linhares AC, Lanzieri R *et al.* Effectiveness of the monovalent G1P[8] human rotavirus vaccine against hospitalization for severe G2P[4] rotavirus gastroenteritis in Belém, Brazil. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2011; 30, 396–401.
- Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, *et al.* Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:1548-57.

- Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM.. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972; 10:1075-81.
- Kapikian AZ., Kim HW., Wyatt RG., *et al.* Reovirus like agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science*. 1974; 185(156):1049-53.
- Kapikian A.Z., Hoshino Y., Chanock R.M. Rotaviruses. *Fields Virology* 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, *et al.* Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 2002; 299:225-39.
- Kawamura N, Tokoeda Y, Oshima M *et al.* Efficacy, safety and immunogenicity of RIX4414 in Japanese infants during the first two years of life. *Vaccine* 2011; 29, 6335–6341.
- Keswick BH, Satterwhite TK, Johnson PC, DuPont HL, Secor SL, *et al.* Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl Environ Microbiol* 1985; 50:261-4.
- Khamrin P, Maneekarn N, Malasao R, *et al.* Genotypic linkages of VP4, VP6, VP7, NSP4, NSP5 genes of rotaviruses circulating among children with acute gastroenteritis in Thailand. *Infect Genet Evol.* 2010;10(4):467-72.
- Kirkwood C, Masendycz PJ, Coulson BS. Characteristics and location of cross-reactive and serotype-specific neutralization sites on VP7 of human G type 9 rotaviruses. *Virology*. 1993;196(1):79-88.
- Kirkwood CD, Bishop RF, Coulson BS. Human rotavirus VP4 contains strain-specific, serotype-specific and cross-reactive neutralization sites. *Arch. Virol.*1996; 141: 587–600.
- Kirkwood CD, Gentsch JR, Glass RI. Sequence analysis of the NSP4 gene from human rotavirus strains isolated in the United States. *Virus Genes*. 1999; 19(2):113-22.
- Kirkwood CD. Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs. *J Infect Dis.* 2010; 1 (202 Suppl):S43-8.
- Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, *et al.* Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods*. 2002; 100(1-2):107-14.
- Kovacs-Nolan J., Yoo D., Mine, Y. Fine mapping of sequential neutralization epitopes on the subunit protein VP8 of human rotavirus. *Biochem J.* 2003; 376(Pt 1), 269-75.
- Kraschnefski M.J., Scott S.A., Holloway G., Coulson B.S., Von Itzstein M., Blanchard H. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the VP8* carbohydrate-binding protein of the human rotavirus strain Wa. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2005; 1;61(Pt 11):989-93.
- Kroneman A, Vennema H, Harris J, Reuter G, von Bonsdorff CH, Hedlund KO, Vainio K, Jackson V, Pothier P, Koch J, Schreier E, Bottiger BE, Koopmans M. Increase in norovirus activity reported in Europe. *Euro Surveill.* 2006; 11: E061214.
- La Rosa G, Fontana S, Di Grazia A Molecular identification and genetic analysis of Norovirus genogroups I and II in water environments: comparative analysis of different reverse transcription-PCR assays. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(13):4152-61.

- Lawton JA, Estes MK, Prasad BV. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat Struct Biol.* 1997;4(2):118-21.
- Leite JP, Alfieri AA, Woods PA, *et al.* Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch Virol.* 1996a; 141, 2365-74.
- Leite JP, Ando T, Noel JS, Jiang B, Humphrey CD, *et al.* Characterization of Toronto virus capsid protein expressed in baculovirus. *Arch Virol* 1996b; 141:865-75.
- Leite JP, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103, 745-53.
- Lima AA, Soares AM, Blaner WS, Guerrant RL, *et al.* Effects of vitamin A supplementation on intestinal barrier function, growth, total parasitic, and specific *Giardia* spp infections in Brazilian children: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010; 50(3):309-15.
- Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, *et al.* Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med.* 2008;5:e31.
- Linhares AC, Pinheiro FP, Schmetz C, *et al.* Duovirus (Rotavirus) in Belem, State of Para, Brazil (preliminary report). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1977; 19(4):278-9.
- Linhares AC, Gabbay YB, Freitas RB, *et al.* Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. *Epidemiol Infect.* 1989; 102(1):129-45.
- Linhares AC, Stupka JA, Ciapponi A, *et al.* Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol.* 2011; 83(3): 377–557.
- LoBue AD, Lindesmith L, Yount B, Harrington PR, Thompson JM, *et al.* Multivalent norovirus vaccines induce strong mucosal and systemic blocking antibodies against multiple strains. *Vaccine* 2006; 24:5220-34.
- López T, Rojas M, López S, Arias CF, *et al.* Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. *J Gen Virol.* 2005; 86(6): 1609-17.
- López S & Arias CF. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 2004;12(6):271-8.
- Lu X, McDonald SM, Tortorici MA, *et al.* Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure.* 2008; 16(11):1678-88.
- Ludert JE, Feng N, Yu JH, *et al.* Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein in vitro and in vivo. *J Virology.* 1996; 70: 487-493.
- Ludert JE, Mason BB, Angel J, Tang B, *et al.* Identification of mutations in the rotavirus protein VP4 that alter sialic-acid-dependent infection. *J Gen Virol.* 1998; 79 (Pt 4):725-9.
- Mahar JE & Kirkwood CD. Characterization of norovirus strains in Australian children from 2006 to 2008: prevalence of recombinant strains. *J Med Virol.* 2011;83(12):2213-9.
- Marks PJ, Vipond IB, Carlisle D, Deakin D, *et al.* Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol Infect.* 2000;124(3):481-7.

- Martella V., Ciarlet M., Pratelli A., Arista S., *et al.* Molecular analysis of the VP7, VP4, VP6, NSP4, and NSP5/6 genes of a buffalo rotavirus strain: identification of the rare P[3] rhesus rotavirus-like VP4 gene allele. *J. Clin. Microbiol.* 2003.;41 (12), 5665-75.
- Mascarenhas JD, Linhares AC, Gabbay YB, *et al.* Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belem, Brazil. *Virus Res.* 2007; 126(1-2): 149-58.
- Mascarenhas JD, Lima CS, de Oliveira DS, *et al.* Identification of two sublineages of genotype G2 rotavirus among diarrheic children in Parauapebas, Southern Pará State, Brazil. *J Med Virol.* 2010;82(4):712-9.
- Matsuno S, Hasegawa A, Kalica AR, Kono R. Isolation of a recombinant between simian and bovine rotaviruses. *J Gen Virol.* 1980; 48: 253-6.
- Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, *et al.* Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol.* 2011;156(8):1397-413.
- Matthijnssens J, Ciarlet M; Heylen E, *et al.* Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol.*2008; 82(7):3204-19.
- Matthijnssens J, Heylen E, Zeller M, *et al.* Phylogenetic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol Biol Evol.* 2010;27(10): 2431-6.
- Mattison K, Shukla A, Cook A, *et al.* Human noroviruses in swine and cattle. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1184-88.
- McClain B, Settembre E, Temple BR, *et al.* X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol.* 2010;397(2):587-99.
- McDonald SM, Aguayo D, Gonzalez-Nilo FD, Patton JT. Shared and group-specific features of the rotavirus RNA polymerase reveal potential determinants of gene reassortment restriction. *J Virol.* 2009a; 83(12):6135-48.
- McDonald SM, Matthijnssens J, McAllen JK, Hine E, *et al.* Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations. *PLoS Pathog.* 2009b; 5(10):e1000634.
- McDonald SM & Patton JT. Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends in Microbiology.* 2011; 19(3):136-44.
- Min BS, Noh YJ, Shin JH, *et al.* Surveillance study (2000 to 2001) of G- and P-type human rotaviruses circulating in South Korea. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42 (9), 4297-4299.
- Ministério da Saúde, 2010. www.datasus.gov.br/ Acesso em 15 de janeiro de 2012, às 14h.
- Mohan KK & Atreya C D. Comparative sequence analysis identified mutations outside the NSP4 cytotoxic domain of tissue culture-adapted ATCC-Wa strain of human rotavirus and a novel inter-species variable domain in its C-terminus. *Arch Virol.* 2000; 145: 1789–1799.
- Monnier N, Higo-Moriguchi K, Sun ZY, *et al.* High-resolution molecular and antigen structure of the VP8* core of a sialic acid-independent human rotavirus strain. Harvard College, Cambridge, MA 02138, USA, 2006.

- Moreno-Espinosa S, Farkas T, Jiang X. Human caliciviruses and pediatric gastroenteritis. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2004;15: 237-245.
- Motomura K, Oka T, Takeda N, Sato H; and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol.* 2008; 82(22):11247-62.
- Nakagomi T, Cuevas .E, Gurgel RG, *et al* Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. *Arch Virol.* 2008a; 153(3):591-3.
- Nakagomi T, Correia JB, Nakagomi O, Montenegro FM, Cuevas LE, *et al.* Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. *Arch Virol* 2008b; 153:957-960.
- Noel JS, Ando T, Leite JP, Green KY, Dingle KE, *et al.* Correlation of patient immune responses with genetically characterized small round-structured viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995. *J Med Virol* 1997;53:372-83.
- O'Ryan M, Lucero Y, Linhares AC. Rotarix®: vaccine performance 6 years postlicensure. *Expert Rev Vaccines.* 2011 ;10(12):1645-59.
- Ouyang Y, Ma H, Jin M, *et al.* Etiology and epidemiology of viral diarrhea in children under the age of five hospitalized in Tianjin, China. *Arch Virol.* 2012.
- Pager CT, Alexander JJ, Steele AD. South African G4P[6] asymptomatic and symptomatic neonatal rotavirus strains differ in their NSP4, VP8*, and VP7 genes. *J Med Virol.* 2000; 62(2):208-16.
- Pang XL, Honma S, Nakata S, Vesikari T. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis* 2000; 181: 288-294.
- Pang XL, Preiksaitis JK, Lee B. Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. *J Clin Virol* 2005; 33: 168-171.
- Pang XL, Preiksaitis JK, Wong S, *et al.* Influence of novel norovirus GII.4 variants on gastroenteritis outbreak dynamics in Alberta and the Northern Territories, Canada between 2000 and 2008. *PLoS One.* 2010; 5(7):e11599.
- Parashar U, Quiroz ES, Mounts AW, Monroe SS, Fankhauser RL, *et al.* "Norwalk-like viruses". Public health consequences and outbreak management. *MMWR Recomm Rep* 2001; 50:1-17.
- Parashar UD, Li JF, Cama R, DeZalia M, Monroe SS, *et al.* Human caliciviruses as a cause of severe gastroenteritis in Peruvian children. *J Infect Dis* 2004.; 190:1088-1092.
- Parashar, UD; Gibson, CJ; Bresse, JS; *et al.* Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(2):304-306.
- Park KS, Jeong HS, Baek KA, *et al.* Genetic analysis of norovirus GII.4 variants circulating in Korea in 2008. *Arch Virol.* 2010; 155(5):635-41.
- Parks CG, Moe CL, Rhodes D, Lima A, Barrett L, *et al.* Genomic diversity of "Norwalk like viruses" (NLVs): pediatric infections in a Brazilian shantytown. *J Med Virol* 1999; 58:426-34.

- Patel, MM; Widdowson, MA; Glass, R; *et al.* Systematic literature review of role of Noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(8):1224-1231.
- Patton JT. Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J Gen Virol.* 1995; 76 (11): 2633-44.
- Pereira HG, Linhares AC, Candeias JA, Glass RI. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. *Bull Pan Am Health Organ.* 1993; 27(3):224-233.
- Perez-Vargas J, Isa P, Lopez S, Arias CF. Rotavirus vaccine: early introduction in Latin America-risks and benefits. *Arch Med Res.* 2006; 37, 1-10.
- Perry JW & Wobus CE. Endocytosis of murine norovirus 1 into murine macrophages is dependent on dynamin II and cholesterol. *J Virol.* 2010; 84(12):6163-76.
- Pietsch C, Schuster V, Liebert UG. A hospital based study on inter- and intragenotypic diversity of human rotavirus A VP4 and VP7 gene segments, Germany. *J Clin Virol.* 2011; 50(2):136-41.
- Podewils LJ, Zanardi Blevins L, Hagenbuch M, Itani D, Burns A, *et al.* Outbreak of norovirus illness associated with a swimming pool. *Epidemiol Infect* 2007; 135:827-33.
- Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science.* 1999; 286:287-290.
- Quetz J da S, Lima IF, Guerrant RL, Lima AA, *et al.* *Campylobacter jejuni* infection and virulence-associated genes in children with moderate to severe diarrhoea admitted to emergency rooms in northeastern Brazil. *J Med Microbiol.* 2012; 61(Pt 4):507-13.
- Rahman M, Sultana R, Ahmed G, *et al.* Prevalence of G2P[4] and G12P[6] rotavirus, Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13: 18-24.
- Reimann HA. Relationship Between Pathogenicity And Ph Tolerance Of Microorganisms. *Science.* 1945a;102:71.
- Reimann HA, Price AH, Elias WF. Streptomycin for certain systemic infections and its effect on the urinary and fecal flora. *Arch Med Interna.* 1945b; 76:269-77.
- Ribeiro LR, Giuberti RS, Barreira DM, Saick KW, Leite JP, *et al.* Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espirito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103:201-6.
- Richards AF, Lopman B, Gunn A, Curry A, Ellis D, *et al.* Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *J Clin Virol* 2003; 26:109-15.
- Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinje J, De Bruin E, *et al.* Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2002; 35:246-53.
- Rockx BH, Vennema H, Hoebe CJ, Duizer E, Koopmans MP. Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. *J Infect Dis* 2005.191:749-754.
- Rossignol JF, Abu-Zekry M, Hussein A, Santoro MG. Effect of nitazoxanide for treatment of severe rotavirus diarrhoea: randomised double-blind placebo-controlled trial. *Lancet.* 2006; 8;368(9530):124-9.

Ruiz-Palacios G. M., Perez-Schael I, Velazquez F. R., *et al.* Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis.. N Engl J Med. 2006; 354, 11-22.

Santos N & Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. Rev. Med. Virol. 2005; 15:29-56.

Santos N & Soares C. Víruses entéricas. Introdução à Virologia Humana. Segunda edição. Guanabara Koogan, 2008.

Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, *et al.* Foodborne illness acquired in the United States, major pathogens. Emerg Infect Dis. 2011;17(1):7-15.

Schmid D, Stüger HP, Lederer I, Pichler AM *et al.* A foodborne norovirus outbreak due to manually prepared salad, Austria 2006. Infection. 2007 ;35(4):232-9.

Scott SA, Holloway G, Coulson BS, *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the sialic acid-binding domain (VP8*) of porcine rotavirus strain CRW-8. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2005;61(6):617-20.

Secretaria de Vigilância em Saúde. In Doenças infecciosas e parasitárias. Guia de bolso. Brasília. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saúde, 2010. Página. 444.

Secretaria Estadual de Saúde do Ceará, 2012. www.saude.ce.gov.br/politicas-de-saude/diretrizes-politicas. Acesso em 15/01/2012 às 15h.

Shanker S, Choi JM, Sankaran B, *et al.* Structural analysis of histo-blood group antigen binding specificity in a norovirus GII.4 epidemic variant: implications for epochal evolution. J Virol. 2011;85(17):8635-45.

Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, *et al.* Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. J Infect Dis. 2009; 200(5):802-12.

Silva MM, Tort LL, Gómez MM, *et al.* Phylogenetic analysis of VP1, VP2, and VP3 gene segments of genotype G5 group A rotavirus strains circulating in Brazil between 1986 and 2005. Virus Research. 2011; 160: 381-8.

Soares CC, Santos N, Beard RS, Albuquerque MC, Maranhao AG, *et al.* Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. Emerg Infect Dis 2007; 13:1244-6.

Steele AD, Madhi SA, Louw CE *et al.* Safety, reactogenicity, and immunogenicity of human rotavirus vaccine RIX4414 in human immunodeficiency virus-positive infants in South Africa. Pediatr. Infect. Dis. J. 2011; 30, 25–30.

Stuart RL, Tan K, Mahar JE *et al.* An outbreak of necrotizing enterocolitis associated with norovirus genotype GII.3. Pediatr Infect Dis J. 2010;29(7):644-7.

Subodh S, Bhan MK, Ray P. Genetic characterization of VP3 gene of group A rotaviruses. Virus Genes. 2006; 33(2), 143-5.

Sugunan AP, Roy S, Murhekar MV, *et al.* Outbreak of rotaviral diarrhoea in a relief camp for tsunami victims at Car Nicobar Island, India. J Public Health (Oxf). 2007; 29(4):449-50.

- Svensson I, Sheshberadaran H, Vene S, *et al.* Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. *J Gen Virol.* 1987; 68:643–651.
- Tacket CO. Plant-derived vaccines against diarrheal diseases. *Vaccine* 2005; 23:1866-9.
- Tafazoli F, Zeng CQ, Estes MK, *et al.* NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells. *J Virol.* 2001; 75(3):1540-6.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007; 24(8):1596-9.
- Taniguchi K & Urasawa S. Diversity in rotavirus genomes. *Seminars in Virology.* 1995;6: 123-31.
- Taraporewala, Z, Chen D, Patton JT. Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *J. Virol.* 1999; 73: 9934-43.
- Taraporewala ZF & Patton JT. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus Res.* 2004; 101: 57-66.
- Tate JE, Patel MM, Steele AD. Global impact of rotavirus vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2010;9(4):395-407.
- Taylor JA & Bellamy AR. Interaction of the rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 with the viral and cellular components. Amsterdam: Elsevier Science, 2003.
- Teunis PFM, Moe CL, Liu P, E. Miller S, Lindesmith L, *et al.* Norwalk virus: How infectious is it? *Journal of Medical Virology.* 2008; 80:1468-76.
- Thorven M, Grahn A, Hedlund KO, Johansson H, Wahlfrid C, *et al.* A homozygous nonsense mutation (428G-->A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. *J Virol* 2005; 79:15351-5.
- Timenetsky MC, Santos N, Gouvea V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(10):2622-4.
- Tort LF, Volotão Ede M, de Mendonça MC, *et al.* Phylogenetic analysis of human P[8]G9 rotavirus strains circulating in Brazil reveals the presence of a novel genetic variant. *J Clin Virol.* 2010; 47(4):345-55.
- Vega E, Vinjé J. Novel GII.12 norovirus strain, United States, 2009-2010. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(8):1516-8.
- Vennema H, de Bruin E, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol.* 2002; 25(2): 233-5.
- Vesikari T., Clark H. F., Offit P. A., *et al.* Effects of the potency and composition of the multivalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine on efficacy, safety and immunogenicity in healthy infants. *Vaccine.* 2006; 24(22), 4821-9.
- Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JP, Miagostovich M. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Pediatr Infect Dis J.* 2007; 26: 602-6.

- Victoria M, Miagostovich MP, Ferreira MS, Vieira CB, Fioretti JM, *et al.* Bayesian coalescent inference reveals high evolutionary rates and expansion of Norovirus populations. *Infect Genet Evol.* 2009; 9:927-32.
- Vidal R, Roessler P, Solari V, Vollaire J, Jiang X, *et al.* Novel recombinant norovirus causing outbreaks of gastroenteritis in Santiago, Chile. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2271-5.
- Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods.* 2004; 116:109-17.
- Wang QH, Han MG, Cheetham S, Souza M, Funk JA, Saif LJ. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1874–81.
- Ward RL & McNeal MM. VP6: A candidate rotavirus vaccine. *J Infect Dis.* 2010; 1;202 Suppl:S101-7.
- Wentz, MJ, Patton, JT, Ramig, RF. The 3-terminal consensus sequence of rotavirus mRNA is the minimal promoter of negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 1996; 70:7833–41.
- Widdowson MA, Glass R, Monroe S, Beard RS, Bateman JW, *et al.* Probable transmission of norovirus on an airplane. *JAMA.* 2005; 293:1859-60.
- Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect.* 2003; 9:247-62.
- World Health Organization Meeting of the Immunization Strategic Advisory Group of Experts, April 2009—conclusions and recommendations. *Weekly Epidemiology.* 2009; 84: 220–36.
- World Health Organization Meeting of the Immunization Strategic Advisory Group of Experts, Novembro de 2011—conclusions and recommendations. *Weekly Epidemiology.* 2011;86 (48): p 541-56.
- Zahorsky J. Hyperemesis hemis or winter vomiting disease. *Arch Pediatr .* 1929; 46:391-395.
- Zao CL, Yu WN, Kao CL, *et al.* Sequence analysis of VP1 and VP7 genes suggests occurrence of a reassortant of G2 rotavirus responsible for an epidemic of gastroenteritis. *J. Gen. Virol.* 1999;80 (Pt 6): 1407-15.
- Zárate S, Cuadras MA, Espinosa R, *et al.* Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J Virol.* 2003; 77(13):7254-60.
- Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, *et al.* Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology.* 2006; 346: 312–23.
- Zheng DP, Widdowson MA, Glass RI, Vinje J. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *J Clin Microbiol* 2010; 48:168-77.