

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Júlia Pantoja Marques

**IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE ROTAVÍRUS CIRCULANTES EM
CRIANÇAS NO AMAPÁ EM APOIO A VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA**

Macapá
2015

Júlia Pantoja Marques

**IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE ROTAVÍRUS CIRCULANTES EM
CRIANÇAS NO AMAPÁ EM APOIO A VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadoras: Joana D'Arc Pereira Mascarenhas
Silvia Maria dos Reis Lopes

Macapá

2015

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Marques, Júlia Pantoja

Identificação de genótipos de rotavírus circulantes em crianças no Amapá em apoio a vigilância epidemiológica. / Julia Pantoja Marques – Macapá: INCQS/FIOCRUZ, 2015.

67 f.: il., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2015.

Orientadores: Joana D'Arc Pereira Mascarenhas, Silvia Maria dos Reis Lopes

1. Rotavirus. 2. Infecções por Rotavirus. 3. Diarreia infantil. 4. Vigilância Epidemiológica. I. Título

Identification of circulating rotavirus strains in children in Amapá in support of epidemiological surveillance.

Júlia Pantoja Marques

**IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE ROTAVÍRUS CIRCULANTES EM
CRIANÇAS NO AMAPÁ EM APOIO A VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto da Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Clarissa Silva Lima (Doutora)
Universidade Federal do Amapá

Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida (Doutor)
Fundação Oswaldo Cruz

Jaqueline Mendes de Oliveira (Doutora)
Fundação Oswaldo Cruz

Joana D'Arc Pereira Mascarenhas (Doutora) – Orientadora
Instituto Evandro Chagas

Silvia Maria dos Reis Lopes (Doutora) – Orientadora
Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde

Dedico esta dissertação às crianças que participaram deste estudo, razão e motivação do nosso trabalho.

AGRADECIMENTOS

"A Deus, senhor de todas as ciências, por sustentar meu ânimo e determinação, a cada novo dia."

Ao Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá, durante a gestão da Diretora Ivanete Costa Amanajás pela oportunidade de me proporcionar este mestrado.

Efetivar esta pesquisa não foi tarefa fácil e contou com o apoio de minha família, colegas, professores e amigos.

À Professora Dra. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas, orientadora e amiga, pela confiança em sustentar os meus próprios caminhos, promovendo autonomia e independência durante todo o processo de aprendizagem, bases fundamentais para a formação de um pesquisador.

Agradeço de forma especial ao colega Helder Pinheiro, pela sua disponibilidade e seu apoio fundamental nas análises estatísticas e gráficos.

Aos profissionais envolvidos na gestão dos serviços de saúde locais e de Vigilância Epidemiológica, bem como a direção dos hospitais envolvidos na pesquisa que facilitaram o acesso às instalações e aos dados, o meu reconhecimento por todo o esforço e contribuição.

Aos colegas do LACEN-AP, Fred Monteiro, Margarete Gomes e aos demais que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa.

Não posso deixar de lembrar o trabalho árduo de Rosimary Cordeiro e Samuel da Costa nos endereços dos pacientes para o preenchimento da ficha clínica epidemiológica e do TCLE.

Aos queridos parceiros, que sempre disponibilizaram sua atenção, ajudando nas técnicas moleculares, Delana Bezerra, Edivaldo Penha, Luana Soares, Fabíola Santos, Mayara Neves e demais colegas do IEC.

À minha mãe e aos meus irmãos, que sempre acreditaram e torceram por mim em todos os momentos da minha vida. Aos sobrinhos Neto, Bianca, Tayná, Cintia, Artur, Alicia e Maria Cecilia. Agradeço especialmente, ao meu marido Rômulo pelas minhas filhas Jorgete, Luana, Luíza e Marina que me fazem experimentar o amor diariamente e me ensinam a ter objetividade, discernimento, determinação, humildade e força para seguir buscando a mim mesma com sabedoria.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas, pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Estima-se que nos países desenvolvidos e em desenvolvimento ocorram 23 milhões de atendimentos ambulatoriais e 2,3 milhões de internações por ano e que o rotavírus do grupo A (RVA) cause óbito em mais de 197.000 crianças a cada ano. Esse vírus acomete, principalmente, crianças menores de 5 anos de idade, particularmente nos países em desenvolvimento. Os RV são classificados no gênero *Rotavirus*, família *Reoviridae*, sendo constituídos por 11 segmentos de ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) os quais se encontram inseridos no core viral. Os RV são classificados em nove grupos ou espécies designados de A a I. O objetivo do presente estudo foi o de detectar os RV em crianças diarreicas e não diarreicas de 0 a 5 anos no município de Macapá, Amapá. O estudo envolveu 161 amostras fecais colhidas de crianças com até cinco anos de idade no período de janeiro de 2014 a agosto de 2015 com ou sem diarreia atendidos em níveis ambulatorial e hospitalar no município de Macapá, Amapá. O RVA foi identificado pelo Ensaio Imunoenzimático (EIE) seguido pela Reação em Cadeia da Polimerase precedida de transcrição Reversa (RT-PCR) e Nested PCR para amplificar os genes VP7 (tipos G) e VP4 (tipos P). A positividade encontrada para RVA foi de 18,6% (30/161), sendo encontrado somente o perfil eletroforético longo nas amostras estudadas (60%). Houve predominância do genótipo emergente G12P[8] circulando em crianças de Macapá, estado do Amapá. Das crianças diarreicas, 43,3% (13/30) associaram febre e vômito ao quadro clínico viral. Com relação ao quadro vacinal, houve associação significativa entre a infecção por RVA e o número de doses da Vacina Oral de Rotavírus Humano (VORH) recebidas ($p < 0,05$), pois entre as crianças que tiveram infecção 70% (21/30) não completaram o esquema vacinal. Os resultados obtidos neste estudo refletem a importância da gastroenterite aguda por RV no estado do Amapá, onde, o genótipo circulante no período estudado foi o tipo emergente G12P[8], circulante na Europa, América e em algumas regiões do Brasil. Desta forma, há a necessidade de estudos adicionais na região, para contribuir com a rede de vigilância em saúde, visando a adoção de medidas educativas e de controle.

Palavras - chave: Diarreia, Rotavírus, Amapá,

ABSTRACT

It is estimated that in developed and developing countries there are 23 million outpatient visits and 2.3 million hospital admissions per year and that the group A rotavirus (RVA) causes death in more than 197,000 children each year, affecting mainly children 5 years of age, particularly in developing countries. RV are classified in the genus *Rotavirus*, *Reoviridae* family being composed of 11 segments of double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) which are inserted into the viral core. RV are classified into nine groups or species designated A through I. The objective of this study was to detect the RV in diarrheal and non-diarrheal children 0-5 years in the city of Macapá, Amapá. The study involved 161 fecal samples from children up to five years from January 2014 to August 2015 with or without diarrhea treated at outpatient and inpatient levels in the city of Macapá, Amapá. The RVA was identified by enzyme immunoassay (EIA) followed by reaction Polymerase Chain preceded by reverse transcription (RT-PCR) and Nested PCR to amplify the VP7 genes (types G) and VP4 (P type). The positivity found for RVA was 18.6% (30/161), only being found throughout the electrophoretic profile in the studied samples (60%). There was a predominance of emerging genotype G12P [8] circulating in children Macapá, State of Amapá. Of diarrheal children, 43.3% (13/30) were associated with fever and vomiting to viral clinical picture. Regarding the vaccine frame, there was a significant association between infection RVA and the number of incoming VORH of doses ($p < 0.05$), as among children who had infection 70% (21/30) did not complete the vaccination schedule. The results of this study reflect the importance of acute gastroenteritis caused by RV in the state of Amapá, with the circulating genotype in the studied period was the emerging type G12P [8], circulating in Europe, America and some parts of Brazil thus confirming the need additional studies in the region, thus contributing to the health surveillance network aimed at the adoption of educational and control measures.

Keywords: diarrhea, Rotavirus, Amapá

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Países que registram mortalidade por RV em crianças menores de cinco anos de idade.	16
Figura 2 - Partículas de rotavírus humano semelhante ao formato de “roda” quando visualizadas por ME	18
Figura 3 – Reconstrução tridimensional da partícula de rotavírus e esquema estrutural do material genômico. Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) demonstrando a migração dos 11 segmentos de RNAdf (visualizados também na partícula central em vermelho) que codificam seis proteínas estruturais (VP1-VP4, VP6-VP7) e seis não estruturais (NSP1-NSP6) de RV.	20
Figura 4 - Representação da estrutura dos genes dos RV.....	21
Figura 5 - Modelo esquemático e etapas da replicação dos rotavírus.	27
Figura 6 – Países com programa de imunização nacional contra o Rotavírus até 29 de setembro de 2015.....	31
Figura 7- Países que registram mortalidade por RV em crianças menores de cinco anos de idade	33
Figura 8 - Mapa do Estado do Amapá.....	39
Figura 9 – Distribuição temporal de Rotavírus no período de 2014-2015. Macapá, Estado do Amapá, Brasil.	48
Figura 10 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA).....	49
Figura 11 – Diagnóstico molecular das amostras positivas para Rotavírus. Macapá, Estado do Amapá, Brasil.	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Localização e funções das proteínas dos rotavírus.....	25
Quadro 2 - Iniciadores utilizados na RT-PCR para os genes VP7 e VP4 de RV.....	44
Quadro 3 -Reagentes necessários para realização da RT-PCR	44
Quadro 4 -Reagentes necessários para realização da SEMI NESTED-PCR	46
Quadro 5 - Tamanho dos fragmentos de amplificação dos tipos G e P de RVA.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Infecção por rotavírus segundo características clínicas apresentadas pelas crianças hospitalizadas. Macapá, Estado do Amapá, Brasil, 2014-2015.....	51
Tabela 2- Características demográficas relacionadas com a infecção por rotavírus em crianças hospitalizadas. Macapá, Estado do Amapá, Brasil, 2014-2015.....	52
Tabela 3 - Infecção por rotavírus segundo ocorrência de aleitamento materno exclusivo, vacinação para rotavírus e a quantidade de suas doses em crianças hospitalizadas. Macapá, Estado do Amapá, Brasil, 2014-2015.....	53
Tabela 4- Características de moradia relacionadas com a infecção por rotavírus em crianças hospitalizadas. Macapá, Estado do Amapá, Brasil, 2014-2015.....	54
Tabela 5 -Análise de regressão multivariada para a presença de infecção por rotavírus em crianças hospitalizadas. Macapá, Estado do Amapá, Brasil, 2014-2015.	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AME - Aleitamento Materno Exclusivo

AstVs - Astrovirus

AiVs - Aichivirus

CoVs - Coronavirus

cDNA- Ácido Desoxirribonucleico complementar

CVS/SESA – Coordenadoria de Vigilância em Saúde/Secretaria de Estado da Saúde do Amapá

DDA - Doença Diarreica Aguda

DLP – partícula com duplo capsídeo

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dsRNA - Ácido Ribonucleico de fita dupla

EIE - Ensaio imunoenzimático

EGPA - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

EPIs - Equipamentos de Proteção Individual

EUA - Estados Unidos da América

FIOCRUZ / IOC – Fundação Oswaldo Cruz / Instituto Oswaldo Cruz

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC -Intervalo de Confiança

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses

IEC - Instituto Evandro Chagas

Kbp - pares de kilobase

kDa - kilo Dalton

LACEN / AP – Laboratório de Saúde Pública

mA - milli-Ámperes

ME - Microscopia Eletrônica

ml - mililitro

mm - milímetro

mRNA - RNA mensageiro

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

ng - nanogramas

nm - nanômetros
NSP -non-structural protein
NB2 – Nível de Biossegurança 2
OMS - Organização Mundial de Saúde
ORF – Open reading frame
PAI – Pronto Atendimento Infantil
POP – Procedimento Operacional Padrão
pb - pares de base
PNI - Programa Nacional de Imunizações
RCWG – Rotavirus Classification Working Group
RER - Retículo Endoplasmático Rugoso
RNA - Ácido Ribonucleico
RNAs (+) - Ácidos Ribonucleicos polaridade positiva
RP – Razão de Prevalência
RRV-TV - Vacina Tetravalente de rotavírus rhesus
RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa
RT-qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa quantitativa
RVA - Rotavírus do grupo A
RV - Rotavírus
STOP – Bloqueador de Reação
SPSS – Statical Package for Social Sciences
SUS - Sistema Único de Saúde
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMB – Tetrametil Benzidina
V - Volts
VORH - Vacina Oral de Rotavírus Humano
VP - viral protein
Xg - gravidade
W - Watts
°C - graus Celsius
μL- microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 HISTÓRICO.....	17
2.2 O ROTAVÍRUS.....	19
2.2.1 Classificação taxonômica.....	19
2.2.2 Organização genômica.....	19
2.2.2 Morfologia e estrutura dos RV.....	21
2.2.3 Classificação.....	21
2.2.4 As proteínas.....	23
2.2.5 Replicação viral e patogênese.....	26
2.2.6 Transmissão.....	27
2.2.7 Sintomatologia e Tratamento.....	29
2.2.8 Imunização.....	30
2.2.9 Epidemiologia do vírus.....	32
2.3.0 Diagnóstico laboratorial.....	35
3 JUSTIFICATIVA.....	37
4 OBJETIVOS.....	38
4.1 OBJETIVO GERAL.....	38
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
5.1 ÁREA DE ESTUDO.....	39
5.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	40
5.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	40
5.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	40
5.5. MATERIAL.....	41
5.6 MÉTODOS.....	41
5.6.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígeno de RVA.....	41
5.6.2 Preparo da suspensão fecal.....	42
5.6.3 Extração do genoma viral.....	42
5.6.4 Determinação dos eletroferotipos por EGPA.....	43
5.6.5 Reação em cadeia pela polimerase, precedida de transcrição Reversa (RT-PCR)	43
5.6.6 Eletroforese em gel de agarose.....	45
5.6.7 Semi Nested-PCR.....	45
5.6.8 Aspectos éticos e de biossegurança.....	47
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
6 RESULTADOS.....	48
6.1 ANÁLISE MOLECULAR.....	48
6.1.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA).....	48
6.1.2 Genótipos G e P de RVA.....	49
6.2 VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS E OS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE GASTRENERITE POR RVA.....	50
6.3 Elaboração do Procedimento Operacional Padrão modelo para as redes sentinelas do RV e Procedimentos Operacional Padrão para o diagnóstico molecular do RV no LACEN/AP.....	55
7 DISCUSSÃO.....	56
7.1 PERFIL MOLECULAR DA INFECÇÃO POR RVA.....	56

7.2 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA INFECÇÃO POR RVA.....	59
8 CONCLUSÃO.....	62
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
10 PERSPECTIVAS	64
REFERÊNCIAS	65
APÊNDICES	74
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	75
APÊNDICE B - FICHA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA.....	78
APÊNDICE – C – MODELO DE POP Critérios de seleção e envio de espécimes fecais para pesquisa de rotavírus AO lacen/ap	82
APÊNDICE – D – POP DE ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	84
APÊNDICE – E – POP DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (EGPA).....	88
APÊNDICE – F – POP DE REALIZAÇÃO DA NESTED-PCR PARA GENOTIPAGEM DE ROTAVÍRUS	94
APÊNDICE – G – POP DE PREPARO DA SUSPENSÃO FECAL	100
APÊNDICE – H – POP DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR) PARA DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS	104
APÊNDICE – I – POP DE REALIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DO GENOMA VIRAL DO ROTAVÍRUS	111
ANEXO	116
ANEXO-A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	117

1 INTRODUÇÃO

A doença diarreica aguda (DDA) é um problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de morbimortalidade infantil, principalmente nos países em desenvolvimento. Estima-se que, em 2010, ocorreu 1,7 bilhão de casos de diarreia em crianças, sendo que 36 milhões evoluíram para casos graves e em 2011, cerca de 700.000 casos de diarreia evoluíram para óbito, embora se registre intervenções altamente eficazes para o tratamento da diarreia (WALKER et al., 2013). Entre crianças menores de cinco anos, estima-se que a cada dia ocorram 1.205 óbitos por RV o que corresponde a 37% das mortes ocasionadas por diarreia e 5% de todos os óbitos (MBUH et al., 2013; PATTON, 2012; TATE et al., 2012).

Entre os principais agentes etiológicos causadores das doenças diarreicas destacam-se as bactérias, toxinas, parasitas e os vírus entéricos como os rotavírus (RV), os quais acometem principalmente crianças menores de cinco anos, além de outros vírus como: norovírus (NoVs), sapovírus (SaVs), adenovírus entéricos (EAdVs) sorotipos 40 e 41, astrovírus (AstVs), parechovírus humanos (HPeVs), aichivírus (AiVs), picobirnavírus, bem como menos frequentemente os torovírus (TOVS) e os coronavírus (CoVs). O rotavírus é o principal agente causador de diarreia severa em crianças (ENSERINK et al., 2015; SHOJA et al., 2014; YU et al., 2015).

A manifestação predominante da gastroenterite é caracterizada pelo aumento do número de evacuações, com fezes aquosas ou de pouca consistência, podendo ser acompanhada de náusea, vômito, febre e dor abdominal. Em geral, a doença é autolimitada e tem duração de 2 a 14 dias variando desde as formas leves até as graves. São observadas ainda desidratação e distúrbios hidroeletrólíticos, principalmente quando associadas à desnutrição (BRASIL, 2005).

O Brasil, embora tenha alcançado importantes avanços no que diz respeito a prevenção e controle das doenças infecciosas, a DDA, ainda continua como um dos principais problemas de saúde pública e representando um grande desafio às autoridades sanitárias. Nesse contexto, embora o registro de número de óbitos por DDA esteja declinando progressivamente em todas as regiões brasileiras, os índices ainda permanecem elevados nas regiões Norte e Nordeste do país (ARAÚJO et al., 2010; RIPSA, 2008) e o número de hospitalizações de crianças com menos de cinco anos por diarreia, caiu de 230 mil (média dos anos 2002–2005) para 187 mil (média dos anos de 2007–2009) casos anuais (DO CARMO et

al., 2011), assim como o número de casos notificados de óbitos infantis associados à diarreia, que diminuiu de 12.317 em 1990, para 2.490 em 2005 e 756 em 2011 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Mesmo assim, a diarreia aguda ainda representa uma importante causa de morbidade e mortalidade infantil.

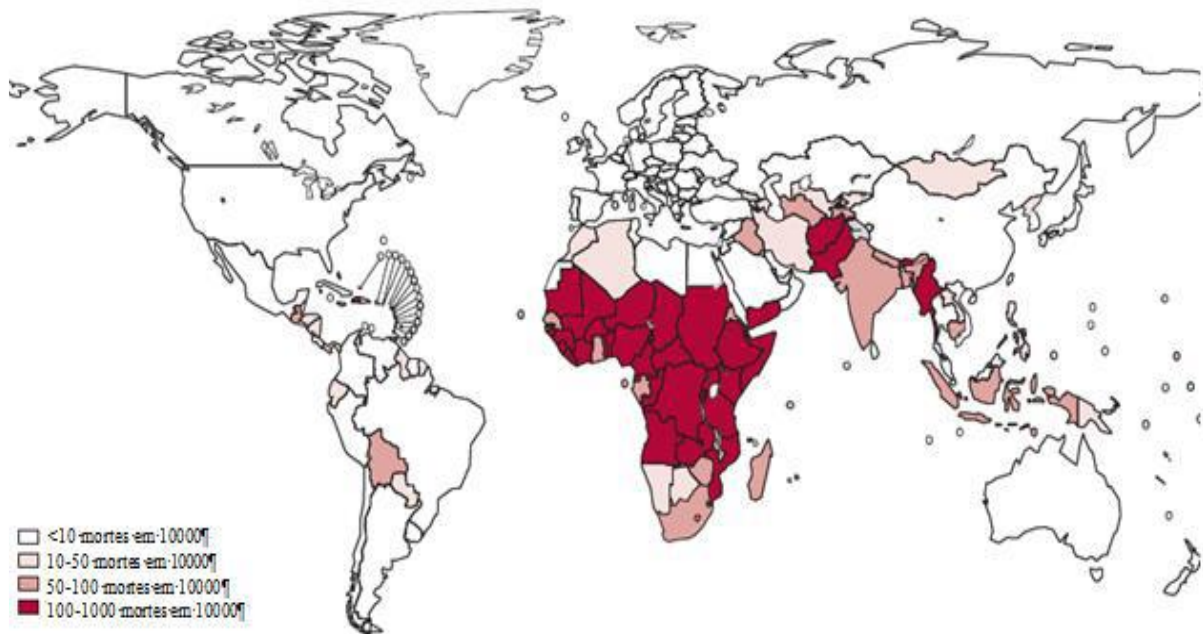
As infecções causadas por RVA têm sido associadas a 3,5 milhões de episódios de DDA, 650 mil visitas ambulatoriais, 92 mil internações e 850 mortes anualmente, entre crianças menores de cinco anos. Estudos envolvendo os níveis secundários e terciários de atenção à saúde conduzida com indivíduos da mesma faixa etária registraram prevalências de diarreia causada por RVA que variaram de 20,7% a 30,9% (BERNSTEIN, 2009; SARTORI et al., 2008).

Estima-se que nos países desenvolvidos e em desenvolvimento ocorram 23 milhões de atendimentos ambulatoriais e 2,3 milhões de internações por ano e que os rotavírus do grupo A (RVA) causem óbito em mais de 197.000 crianças a cada ano, acometendo principalmente crianças menores de 5 anos de idade, particularmente nos países em desenvolvimento, sendo que mais de 80% dessas mortes são registradas na África Subsaariana e no Sudeste Asiático. Na Índia ocorrem ainda 100.000 óbitos por ano em decorrência de infecções causadas por RV (LANATA et al., 2013; PARASHAR et al., 2009; PATTON, 2012; TATE et al., 2012; WHO, 2013).

De acordo com os indicadores de mortalidade do Brasil, no ano de 2011 ocorreram 3.449 óbitos relacionados à diarreia e à gastroenterite de origem infecciosa presumível (BRASIL, 2013). No Pará, o índice de infecção chegou a 40% de positividade para RVA (LINHARES; ARAUJO; JUSTINO, 2013). Portanto, os RV continuam sendo considerados uma importante causa de internação hospitalar.

Segundo Patton (2012), quase todas as crianças com até cinco anos de idade serão infectadas por RV, pelo menos uma vez, independentemente da condição socioeconômica e do país de origem. A morbidade causada por RV em crianças é semelhante em ambos os países, desenvolvidos e em desenvolvimento. No entanto, a mortalidade de crianças dos países em desenvolvimento é maior, possivelmente devido a fatores incluindo o abandono precoce do aleitamento materno, baixo nível educacional e más condições higiênico-sanitárias. Associado a isso, o crescimento populacional que, na maioria das vezes não é acompanhado da melhoria das condições de vida da população, contribui substancialmente para o agravamento deste problema conforme demonstrado na figura 1.

Figura 1 – Países que registram mortalidade por RV em crianças menores de cinco anos de idade.



Adaptada de Tate et al.,(2012).

Têm-se registros de que nos países em desenvolvimento houve melhora das condições sanitárias, de higiene e de acesso ao abastecimento de água potável e que tais fatores possam contribuir efetivamente para determinar a prevenção e controle das DDA, embora isso ainda não seja suficiente para evitar a gastroenterite causada por RVA. Desta forma, o desenvolvimento de vacinas, a serem utilizadas em larga escala, se constitui na principal estratégia para a prevenção da doença grave causada por rotavírus, uma vez que a vacina oferece proteção contra a reinfecção oferecendo significativo resultado sobre o impacto da doença, principalmente nos países mais pobres (YEN et al., 2011).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

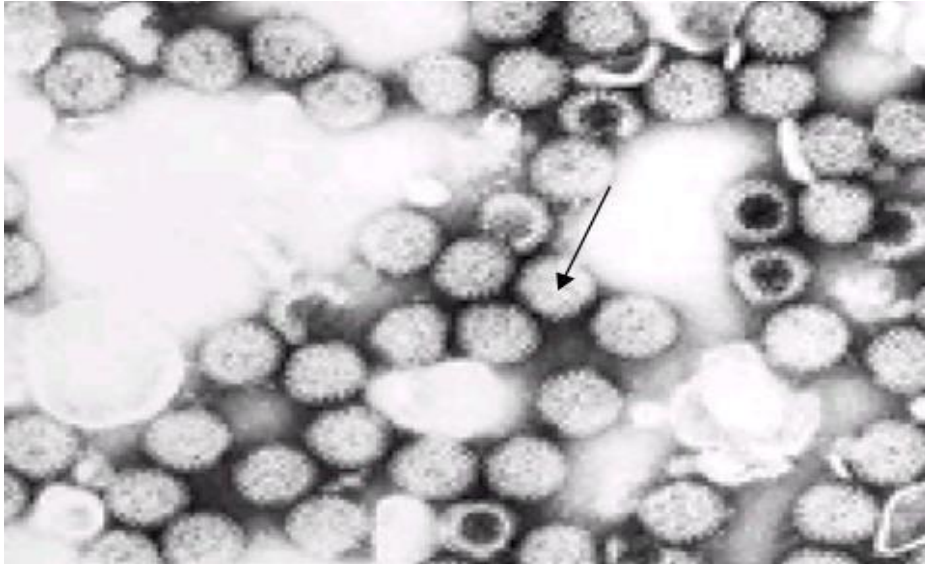
2.1 HISTÓRICO

A procura por agentes etiológicos que causavam diarreia grave em crianças despertou o interesse de pesquisadores a investigar bactérias, vírus ou parasitas. No entanto, apesar de significativas descobertas, até meados da década de 60, não havia sido detectado um agente responsável pela ocorrência da maioria dos casos graves de gastroenterite (ESTES; KAPIKIAN, 2001).

A importância dos agentes virais começou a ser elucidada no início da década de 70 com a descoberta do vírus Norwalk, em 1972 e posteriormente do RV, em 1973, comprovando-se dessa maneira, a participação desses patógenos na maioria dos casos diarreicos de origem não bacteriana (BISHOP et al., 1973).

A partir da década de 70 quando Bishop et al.(1973), analisaram por microscopia eletrônica (ME) cortes histológicos da mucosa duodenal de nove crianças foi evidenciada a presença de uma partícula de 70 nm de diâmetro, a qual acreditou-se ser uma importante causa de gastroenterite esporádica em crianças em Melbourne, Australia. Tal agente foi denominado de Orbivirus-like. No ano seguinte, dois estudos independentes, foram realizados, um no Reino Unido por Flewett et al.(1974) e outro na Austrália realizado por Bishop et al.(1974), que detectaram por ME, partículas virais com características semelhantes aos RV em amostras fecais de crianças com gastroenterite aguda. Esta partícula de 70nm descrita em casos de gastroenterite aguda (GA) foi recebendo diferentes denominações, como *Reovirus-like* (WYATT et al., 1974), *Duovirus* (DAVIDSON et al., 1975), e finalmente *Rotavirus* (FLEWETT et al., 1974). O nome RV foi oficializado em 1979 pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral, denominação esta devido a sua semelhança morfológica a uma roda quando observado em ME, conforme demonstrado na figura 2 (MATTHEWS, 1979).

Figura 2 - Partículas de rotavírus humano semelhante ao formato de “roda” quando visualizadas por ME



Fonte: Adaptada de Kapikian, Hoshino, Chanock (2001)

No Brasil, os RV foram detectados pela primeira vez em 1976 na cidade de Belém, Pará, em amostras de fezes de crianças com quadro de diarreia aguda diagnosticadas por Linhares et al. (1977) que visualizaram por ME e Ensaio imunoenzimático (EIE) o RVA. A partir do achado de Linhares e colaboradores, diversos pesquisadores descreveram a ocorrência de RV como causador de GA e inúmeros estudos epidemiológicos foram realizados no país, integrando um espectro que abrange desde os primeiros achados por ME até a caracterização molecular das estirpes virais circulantes (ANDREASI et al., 2007; ARAUJO et al., 2001; BALDACCI et al., 1979; LINHARES et al., 2011; LUZ et al., 2005; MASCARENHAS et al., 1997; PEREIRA et al., 1983; SANTOS et al., 2003; STEWIEN et al., 1991).

Nesse contexto, os RV têm sido considerados como importantes agentes etiológicos na gênese da gastroenterite aguda, alcançando percentuais que variaram de 30% a 50% das diarreias graves tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

2.2 O ROTAVÍRUS

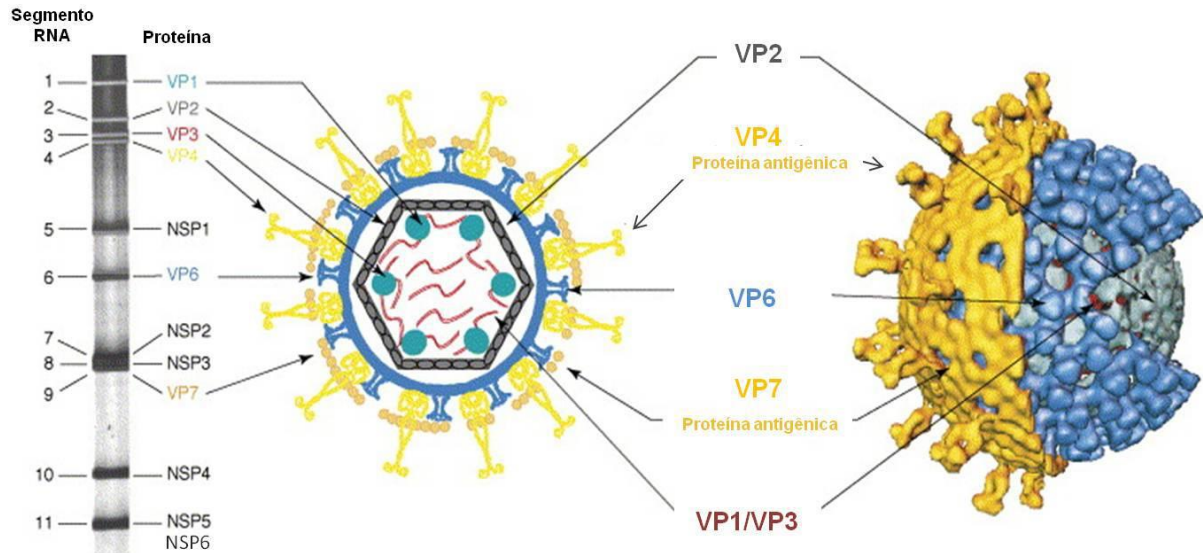
2.2.1 Classificação taxonômica

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), os RV são classificados no gênero *Rotavirus*, família *Reoviridae* e subfamília *Sedoreovirinae* (DESSELBERGER, 2014).

2.2.2 Organização genômica

Os RV estão organizados dentro de um genoma formado por 18.500 pares de base (pb) (DESSELBERGER, 2014) sendo constituídos por 11 segmentos de ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) os quais se encontram inseridos no core viral. Apresentam pesos moleculares que variam de 0,6 a 3,3 pares de kilobase (Kbp), característica esta que permite a separação dos segmentos de RNA por técnicas de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA) (MUNFORD; CARUSO; RACZ, 2008). Os 11 segmentos de RNA codificam para seis proteínas estruturais denominadas com a sigla VP (viral protein) que são designadas por um número arábico correspondente ao segmento genômico codificante que lhes originou (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7) e seis proteínas não-estruturais, denominadas NSP (non-structural protein) designadas de NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6 (ESTES; KAPIKIAN, 2007; GUNN et al., 2012). Cada segmento do gene é monocistrônico com exceção do segmento 11, que é policistrônico e codificam para dois polipeptídios (NSP5 e NSP6) conforme esquematizado na figura 3 (ESTES; GREENBERG, 2013; GUNN et al., 2012).

Figura 3 – Reconstrução tridimensional da partícula de rotavírus e esquema estrutural do material genômico. Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) demonstrando a migração dos 11 segmentos de RNA (visualizados também na partícula central em vermelho) que codificam seis proteínas estruturais (VP1-VP4, VP6-VP7) e seis não estruturais (NSP1-NSP6) de RV.



Fonte: Adaptada de Parashar et al., (2006).

Os segmentos genômicos dos RV apresentam fita de polaridade positiva e possuem na sua extremidade uma sequência 5'-guanidina seguida de uma sequência conservada que faz parte da região 5' não-codificante. Cada gene possui uma fase de leitura aberta (ORF) que é importante para codificação da proteína, seguido por um códon de finalização além de outra região não codificadora, que fica na extremidade 3', a qual é finalizada pela sequência 3'-citidina terminal como mostra a Figura 4 (ESTES; KAPIKIAN, 2007). Todos os onze segmentos de RNA apresentam sequências de nucleotídeos terminal 5'- GGC...ACC-3' extremamente conservadas (DESSELBERGER, 2014).

Figura 4 - Representação da estrutura dos genes dos RV.



Fonte: Adaptado de Estes e Kapikian, (2001).

2.2.2 Morfologia e estrutura dos RV

A partícula viral dos RV tem simetria icosaédrica medindo cerca de 100 nanômetros (nm) de diâmetro, desprovido de envelope lipoprotéico e dotado de núcleo capsídeo sendo composto por três camadas concêntricas de proteínas (COSTA et al., 2012; ESTES; KAPIKIAN, 2007). Nos 12 eixos de simetria icosaédrica existem canais que atravessam as três camadas proteicas. Estes canais permitem a importação de metabólitos necessários para a transcrição do genoma viral e a exportação dos transcritos de ácido ribonucleico (RNA) viral (HARRISON, 2007).

2.2.3 Classificação

Os RV são classificados em nove grupos ou espécies designados de A a I, com base nas propriedades antigênicas e, mais recente, na sequência de aminoácidos da proteína VP6 do capsídeo intermediário (TROJNAR et al., 2013). Atualmente, o grupo I foi registrado durante um estudo realizado com fezes de cães da Hungria (MIHALOV-KOVÁCS et al., 2015).

Os RVA são os mais importantes epidemiologicamente, sendo responsáveis pelo maior número de episódios diarreicos e representando o alvo dos programas vacinais ora vigentes. Representam os principais agentes etiológicos causadores de DDA infantil em todo

o mundo sendo responsáveis por aproximadamente um quarto dos óbitos associados à diarreia entre crianças abaixo de 5 anos de idade, com ênfase para os países em desenvolvimento (PARASHAR et al., 2006). São vírus cosmopolitas e também infectam animais de várias espécies incluindo mamíferos e aves (CHANDLER-BOSTOCK et al., 2015; LUCCHELLI et al., 1992).

Os RV dos grupos B, C e H também já foram identificados causando doença diarreica em seres humanos, enquanto os demais foram identificados apenas em animais (ATTOUI; J BECNEL, 2012; ESTES; KAPIKIAN, 2007; TROJNAR et al., 2010).

Dentro do grupo A, são definidos subgrupos (SG) e sorotipos/genótipos. Os SG são designados de SGI, SGII, SGI+II e SG não-I/não-II. Com base na caracterização molecular da proteína VP6, os mesmos podem ser distinguidos em dois genogrupos: Genogrupo I correspondendo ao SGI e Genogrupo II, os quais reúnem os demais SG (ITURRIZA-GOMARA et al., 2002).

Com base na combinação binária envolvendo os genótipos G e P, os que apresentam maior relevância epidemiológica global pertencem ao grupo A e incluem os tipos: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8], considerado emergente e classificado como o quinto em importância global (SIQUEIRA et al., 2010); WHO, 2011). Em países desenvolvidos essas cepas comuns podem causar aproximadamente 100% das infecções em alguns períodos (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2011). Contudo, muitas, se não todas, podem co-circular criando condições a favor da formação de vírus recombinantes (PAYNE et al., 2009; WHO, 2011).

Notavelmente, os tipos G e P de cepas incomuns mostram variação de uma região para outra. A Organização Mundial de Saúde (OMS) registrou que em 2010 as cepas incomuns predominantes foram: G12P[8] e G12P[6] no sudeste da Ásia, G2P[6], G3P[6], e G1P[6] na África subsaariana, G1P[4] e G2P[8] no oeste do Pacífico e G9P[4] e G12P[6] nas Américas (DA SILVA SOARES et al., 2012; SOARES et al., 2012; WHO, 2011).

Mais recentemente, os RV têm sido classificados em diferentes genótipos baseados nas características moleculares dos genes VP7- VP4- VP6- VP1- VP2- VP3- NSP1- NSP2- NSP3- NSP4- NSP5/6, designados de Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, respectivamente. Até o presente momento os seguintes genótipos têm sido descritos: 27G, 37P, 16I, 9R, 9C, 9M, 16A, 9N, 12T, 14E e 11H. Essa nova classificação permite um melhor entendimento da função de cada proteína e o relacionamento evolucionário entre as espécies (MATTHIJNSSENS et al., 2011; TROJNAR et al., 2013).

O RVA do tipo G12 foi detectado pela primeira vez em crianças com diarreia nas Filipinas em 1987 (TANIGUCHI et al., 1990). No Brasil, estirpes de G12 foram descritas na região Sul em 2003 e na região norte no período de 2008-2010, em combinação com os genótipos P[9] e P[6], respectivamente (SOARES et al., 2012).

Recentemente, este genótipo foi descrito em vários estudos realizados em todo o mundo e sua disseminação global foi demonstrada na última década (MATTHIJNSSENS et al., 2010; RAHMAN et al., 2007). Pelo fato do G12 ter sido encontrado em muitas partes do mundo durante a última década, ele provavelmente irá em breve tornar-se o sexto maior genótipo. Além disso, a completa caracterização do genoma de estirpes de RV G12 deve ser encorajada a fim de se ampliar a compreensão sobre a sua evolução e possível impacto no desenvolvimento de vacinas (SOARES et al., 2012)

2.2.4 As proteínas

Na figura 3 é possível a visualização da partícula viral do RV evidenciando o capsídeo interno ou core, o qual circunda o genoma viral e é formado pelas proteínas VP1, VP2 e VP3. O capsídeo intermediário é constituído pela proteína VP6, a qual confere especificidade para grupo e subgrupo, e o capsídeo externo pelas proteínas VP4 e VP7, as quais estão relacionadas à produção de anticorpos neutralizantes que são essenciais para a proteção contra a infecção (COSTA et al., 2012; MATTHIJNSSENS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2007).

A VP6 é a proteína mais abundante do vírion e é importante para a classificação do RV em nove espécies (A-I), sendo também alvo de detecção do RV por ensaios imunoenzimáticos (MBUH et al., 2013; MIHALOV-KOVÁCS et al., 2015; PATTON, 2012).

As duas proteínas que compõem o capsídeo externo do vírion, a VP7 (Glicoproteína) em maiores concentrações e a VP4 (sensível à Protease) em pequena quantidade, são importantes para a diversidade genética dos RV e formam a base para a classificação binária em sorotipo/genótipo G e P, respectivamente. Segundo Matthijnsens et al. (2011), até o momento foram descritos 27 genótipos G e 37 genótipos P. A proteína VP4 é formada por 776 aminoácidos, é imunogênica e variações nessa proteína levam a diferentes sorotipos/genótipos P. Os sorotipos P são assim denominados quando identificados por métodos sorológicos; e os genótipos P, por métodos moleculares. A nomenclatura dos sorotipos de VP4 é realizada utilizando a letra P seguida de algarismo arábico, enquanto que,

para genótipos, utiliza-se também a letra P, mas com o numeral dentro de colchetes (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A proteína VP4 sofre a ação de enzimas proteolíticas, originando os polipeptídeos VP5*, com 529 aminoácidos e o VP8*, com 247 aminoácidos os quais desempenham importante papel no processo de reconhecimento dos receptores (integrina e ácido siálico) levando ao aumento da infectividade viral e da entrada do vírus na célula (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001; SANTOS; SOARES, 2008).

O peptídeo VP5* se associa com a atividade de neutralização cruzada entre os diferentes tipos de VP4 e, possivelmente, possui os epítomos responsáveis pela adsorção do vírus à célula, já que possui atividade lipofílica. Já o peptídeo VP8*, tem sido encontrado exercendo um significativo papel no potencial infeccioso viral e no processo de neutralização os quais se localizam nas posições M1-L10, I35-R44, I55-D66, V115-G123 e L223-P234 (KOVACS-NOLAN; MINE, 2006), além de possuir a maioria dos epítomos associados às reações tipo-específicas. Portanto, a proteína VP4 tem importante papel na aderência e penetração do vírus na célula hospedeira, também estando implicada na hemaglutinização, neutralização e virulência (ESTES; KAPIKIAN, 2007; RUIZ et al., 2009).

No que diz respeito a proteínas não-estruturais, elas possuem várias funções virais, incluindo replicação do genoma, montagem de partículas, regulação da resposta inata do hospedeiro (FENG et al., 2008) e estimulação da expressão gênica viral (PATTON, 2012). Entre estas, destaca-se a NSP4 - produto do gene 10, cujo potencial enterotoxigênico desencadearia processo diarreico secretório na vigência da infecção pelos RVA (LINHARES; ARAUJO; JUSTINO, 2013).

O Quadro 1 demonstra a localização e as principais funções das proteínas que compõem a estrutura viral.

Quadro 1 – Localização e funções das proteínas dos rotavírus

Segmento Genômico	Proteína	Localização	Função
1	VP1	Core	RNA-polimerase -RNA-dependente
2	VP2	Core	Ligação ao RNA viral
3	VP3	Core	Guanililtransferase
4	VP4 (VP5* e VP8*)	Capsídeo externo	Hemaglutinina, proteína de ligação à célula, peptídeo de fusão, antígeno neutralizante
5	NSP1	Não-estrutural	Ligação ao RNA viral
6	VP6	Capsídeo interno	Antígeno de subgrupo necessário para a Transcrição
7	NSP3	Não-estrutural	Inibe a tradução de proteínas celulares, ligação ao terminal do mRNA viral
8	NSP2	Não-estrutural	Ligação ao RNA, helicase, NTPase, forma viroplasmas com NSP5
9	VP7	Capsídeo externo	Glicoproteína antígeno neutralizante
10	NSP4	Não-estrutural	Glicoproteína, papel na morfogênese, modula cálcio intracelular, enterotoxina
11	NSP5	Não-estrutural	Ligação ao RNA, forma viroplasma com NSP2, Interege com VP2 e NSP6
	NSP6	Não-estrutural	Interege com NSP5, presente no viroplasma

Fonte: Santos e Soares, 2008.

2.2.5 Replicação viral e patogênese

Os RV possuem dois mecanismos básicos de invasão celular: a penetração direta por meio da membrana ou a endocitose. De modo geral, esse vírus possui um tropismo celular natural pelos enterócitos maduros do epitélio superior e médio das vilosidades do intestino delgado. Após a invasão celular, os enterócitos infectados são eliminados no sentido do lúmen intestinal, havendo substituição de tais células por enteroblastos que migram das criptas intestinais, as quais têm a capacidade de absorção reduzida, resultando em diarreia (ESTES; KAPIKIAN, 2007; TAFAZOLI et al., 2001).

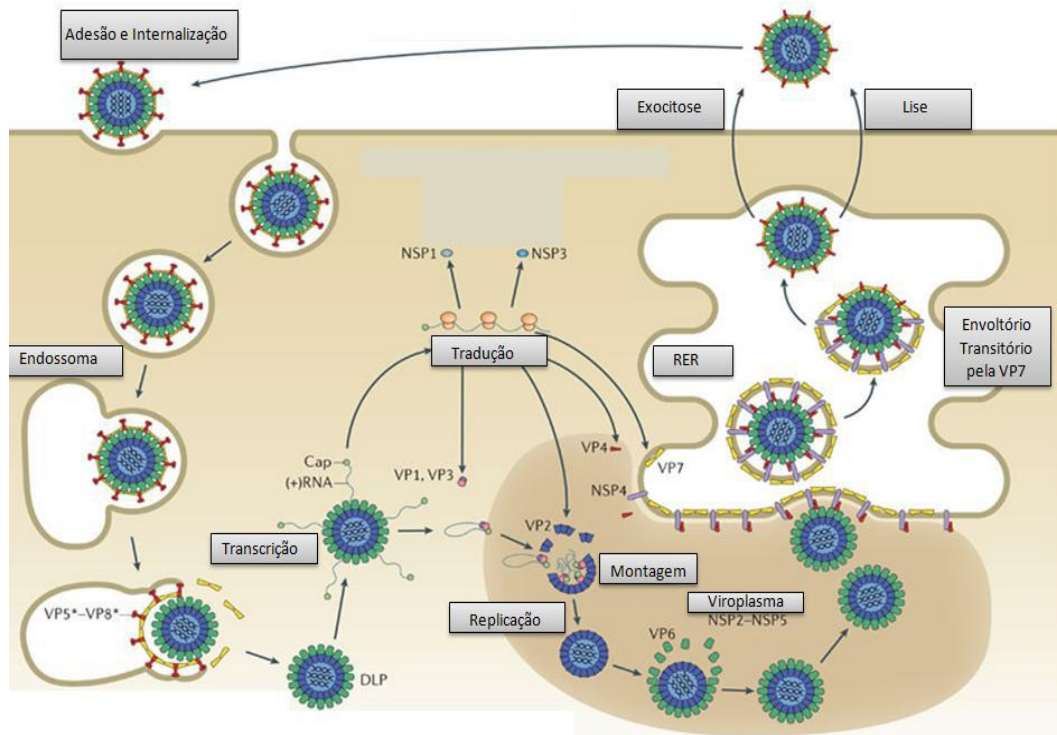
Tais mecanismos têm sido propostos para explicar a diarreia e incluem a má absorção secundária, a destruição dos enterócitos, a interrupção da função de absorção enterocítica, a isquemia das vilosidades, a enterotoxina NSP4 e a ativação do sistema nervoso entérico (ESTES; GREENBERG, 2013).

A enterotoxina NSP4 do RV aumenta os níveis intracelulares de cálcio desestabilizando a permeabilidade da membrana plasmática. Este processo promove o aumento da passagem de água e eletrólitos para dentro da luz intestinal e o processo inflamatório da submucosa causando a diarreia secretória (ESTES; GREENBERG, 2013).

Durante a infecção por RV há também a redução da atividade inerente das enzimas dissacaridases, principalmente da lactase, comprometendo o desdobramento dos dissacarídeos e sua absorção, promovendo um aumento da osmolaridade do lúmen intestinal e, conseqüentemente, aumento do fluxo de líquido e diarreia caracterizada pelo mecanismo osmótico (VRANJAC, 2004).

A replicação deste agente ocorre principalmente no trato gastrintestinal onde o mesmo desestabiliza a função de absorção dos enterócitos presentes nas microvilosidades intestinais. Este vírus também mostrou a capacidade de transpor o trato gastrointestinal causando manifestações clínicas atípicas tendo sido encontrado em células mononucleares do sangue periférico durante a fase aguda da infecção causando antigenemia (BLUTT et al., 2007; ESTES; GREENBERG, 2013; PATEL et al., 2010). O processo de replicação do RV está elucidado na Figura 5.

Figura 5 - Modelo esquemático e etapas da replicação dos rotavírus.



Fonte: Adaptado de Trask, Mcdonald, Patton 2012.

2.2.6 Transmissão

Os RV são transmitidos pela via fecal-oral. Nesse contexto, a água e os alimentos contaminados exercem papel fundamental na disseminação deste agente viral, embora outras vias tenham sido estudadas, como contato com fômites e secreções respiratórias também tenham sido especuladas como uma fonte de infecção (GANIME et al., 2012; MBUH et al., 2013). Estudo *in vitro* conduzido em suínos inoculados por via intranasal com RV humano levou a observação de diarreia nesses animais (AZEVEDO et al., 2005)

A transmissão fecal-oral tem sido classicamente descrita, reforçada pela elevada excreção viral consubstanciada pela eliminação de até um trilhão de partículas virais por mL de fezes e com a dose mínima infectante de até 10 vírions (OLIVEIRA et al., 2007). As partículas infecciosas do RV são altamente estáveis podendo permanecer viáveis por longos períodos (1 a 10 dias) sobre superfícies e em ambientes com pouca umidade (GLEIZES et al., 2006). As partículas virais são resistentes aos desinfetantes comuns mantendo seu potencial infeccioso por vários meses, em temperaturas que variam entre -40°C e -200°C, sendo ainda

capazes de se manterem viáveis nas mãos durante horas (PARASHAR et al., 2003; VRANJAC, 2004).

Esta é uma das razões pela qual é difícil se realizar o controle desse vírus em ambientes de cuidados pediátricos, onde eles são introduzidos a partir da comunidade. No que diz respeito à infecção nosocomial, os RV se constituem na causa mais comum de gastroenterite viral adquirida no hospital. Estudos demonstram que 11-32% das infecções por RV são adquiridas no hospital sugerindo que as infecções nosocomiais representam um percentual significativo da doença mostrando que aproximadamente 1 em 35 pacientes pediátricos hospitalares são acometidos por um episódio de gastroenterite em ambiente nosocomial (BRUIJNING-VERHAGEN; QUACH; BONTEN, 2012; GLEIZES et al., 2006).

Nesse contexto, a principal investigação sobre as infecções nosocomiais por RV no Brasil refere-se ao estudo de Gusmão et al. (1994) conduzido no período de 1992 a 1994, o qual envolveu 237 crianças atendidas em um hospital público de Belém. Os dados obtidos neste estudo demonstram que os RV foram responsáveis por 30% dos episódios diarreicos ocorridos no período da internação, assim como 7% das infecções assintomáticas entre crianças menores de cinco anos.

Estudos demonstram ainda rearranjos genéticos entre cepas de RV que infectam animais e seres humanos como aquele envolvendo cepas com rearranjos bovino-humana (I321 e 116E) e uma cepa recombinante suíno-humana (G5) que foram consideradas endêmicas causando gastroenterites na Índia e no Brasil, respectivamente (ESTES; GREENBERG, 2013). Tais eventos possibilitam a geração de novas variantes de RV. Acredita-se que a possível transmissão entre as espécies seja facilitada pelo convívio do homem com animais de diferentes espécies, sendo que tal fenômeno ocorre com mais frequência nos países em desenvolvimento (GHOSH et al., 2011; MARTELLA et al., 2010; MASCARENHAS et al., 2007).

Em Belém do Pará, Mascarenhas et al. (2007) identificaram amostra fecal de neonato com rearranjo entre cepas de origem humana e suína. Esta combinação foi posteriormente analisada envolvendo todos os genes durante um estudo realizado em Belém por Maestri et al., (2012). Esta relação de rearranjo envolvendo estirpes humana e animal é importante e requer estudos de vigilância intensiva deste agente, principalmente no que diz respeito ao monitoramento dos genótipos circulantes em um cenário pós introdução da vacina.

2.2.7 Sintomatologia e Tratamento

A infecção por rotavírus varia desde a forma assintomática até a forma moderada ou grave sendo que a maior incidência da infecção sintomática ocorre na faixa etária dos 6 aos 24 meses com registro dos casos de gastroenterite grave nessa idade variando de 12 a 71% dos casos (O'RYAN et al., 2001). As infecções assintomáticas são mais comuns em neonatos e crianças com até quatro meses de idade, provavelmente por conta da proteção conferida pelos anticorpos maternos (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001; LINHARES et al., 1989).

O período de incubação da infecção por rotavírus em geral ocorre de 1 a 3 dias sendo a doença caracterizada pelo início abrupto de diarreia, febre, vômitos, irritabilidade e letargia (LINHARES; BRESEE, 2000). Os sintomas mais proeminentes são caracterizados pela diarreia e o vômito, muitas vezes levando à desidratação, choque e óbito se não for tratado adequadamente principalmente quando se tratar de idosos e crianças desnutridas (MBUH et al., 2013).

Não existe até o presente momento um tratamento específico contra os RV, embora a OMS preconize a reidratação oral, objetivando a reposição hidroeletrólítica ocorrida devido a desidratação e naqueles casos mais graves, a administração por via endovenosa, principalmente nos casos de desequilíbrio ácido-básico (ALAM; ASHRAF, 2003; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Ainda no que diz respeito a tratamento, estudo mais recente realizado sobre a atividade antiviral da nitazoxanida aponta que os thiazolides inibem a replicação do rotavírus já que podem interferir na morfogênese viral. Tais achados podem representar uma nova classe de drogas antivirais eficazes contra a gastroenterite por RV (LA FRAZIA et al., 2013).

Portanto, o recurso mais efetivo de profilaxia das diarreias por RVA está no uso de uma vacina eficaz. Dessa maneira, a introdução de um imunizante eficaz contra RVA tem melhorado substancialmente o impacto da mortalidade atribuída à diarreia causada por RVA em todo o mundo (TATE et al., 2012). Porém, mesmo com o advento de novas vacinas seguras e eficazes, o uso do soro oral preconizado pela OMS bem como a manutenção do aleitamento materno ainda se configura em procedimentos básicos e insubstituíveis que se revestem de extrema importância (LINHARES; ARAUJO; JUSTINO, 2013).

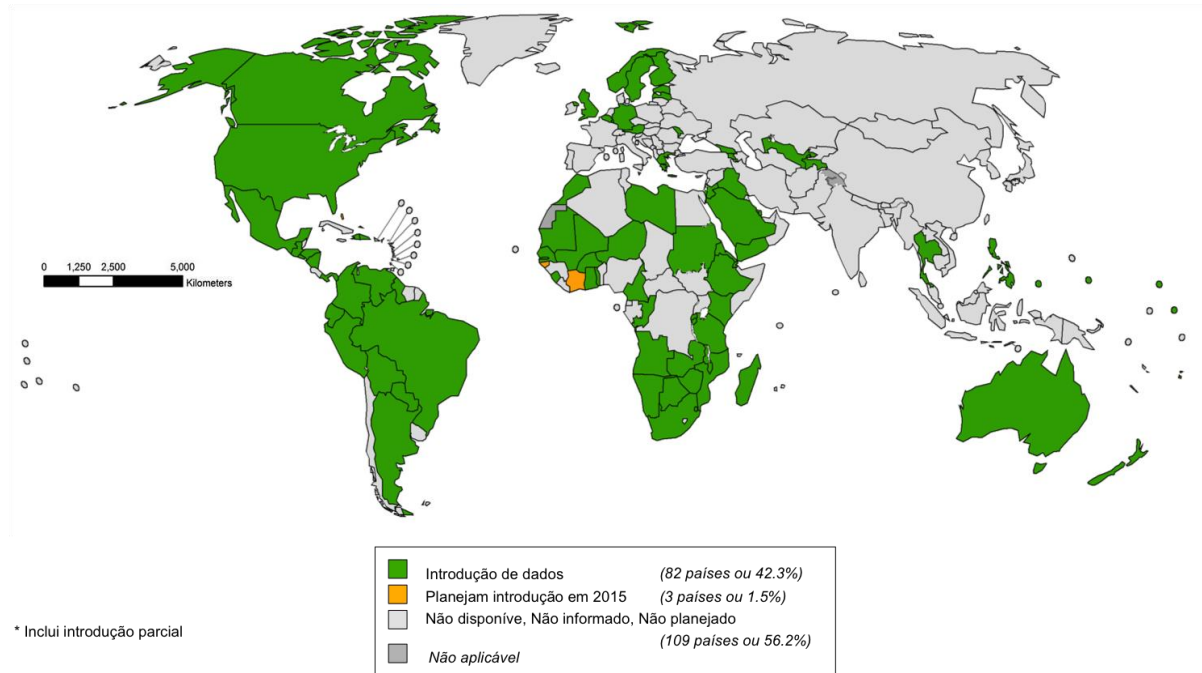
2.2.8 Imunização

A primeira vacina contra RVA foi licenciada nos Estados Unidos da América (EUA) em 1998 e denominada de Vacina Tetravalente de Rotavírus Rhesus (RRV-TV) sendo comercializada para uso em humanos com o nome de Rotashield™. Tal imunizante reunia as especificidades genóticas G1, G2 e G4 de origem humana, adicionadas ao G3 da amostra original de rotavírus de origem símia. Entretanto, um ano depois de sua comercialização a mesma foi suspensa devido ao aumento no número de casos de intussuscepção, que é um tipo de obstrução intestinal que ocorreu nas crianças vacinadas (BRICKS, 2005).

Desde 2006, duas vacinas orais contendo cepas atenuadas têm sido licenciadas e estão disponíveis comercialmente: uma vacina humana bovina, pentavalente e específica para os genótipos G1, G2, G3, G4 e P[8] e designada de RotaTeq™ a qual é produzida pela Merck &Co, e a outra, de origem humana, monovalente, genótipo G1P[8], designada de vacina oral de rotavírus humano (V.O.R.H.), denominada de Rotarix™ que é produzida pela GlaxoSmithKline Biologicals (O'RYAN; LINHARES, 2009; YEN et al., 2011). Ambas são recomendadas pela OMS para uso em todos os países, em particular naqueles com alta mortalidade por rotavírus. A vacina monovalente é a única que está disponível no calendário de vacinação do Ministério da Saúde e é administrada em duas doses. Já a vacina pentavalente, está disponível somente em clínicas privadas. A redução da morbidade e mortalidade foi notória naqueles países que adotaram tais vacinas em seus calendários de imunização (TATE; PARASHAR, 2014).

Até setembro de 2015, 82 países em todo o mundo haviam introduzido a VORH no Plano Nacional de Vacinação (PNI) além de cinco países (Canadá, Suécia, Mali, Filipinas e Tailândia) que introduziram a vacina apenas regionalmente (WHO, 2015), conforme mostra a figura 6. Por outro lado, esta vacina ainda não foi introduzida no setor público em vários países latino-americanos como Argentina, Chile, Cuba e Uruguai (LINHARES; ARAUJO; JUSTINO, 2013). Nesse contexto registra-se que o Brasil foi o primeiro país da América Latina a introduzir a vacina contra RVA no calendário de vacinação do PNI, em março de 2006, o que resultou num cenário epidemiológico único (LEITE; CARVALHO-COSTA; LINHARES, 2008).

Figura 6 – Países com programa de imunização nacional contra o Rotavírus até 29 de setembro de 2015.



Fonte: Adaptado de WHO (2015).

Estudos prévios com ensaios clínicos com ambas as vacinas foram realizados na América Latina, EUA e Europa demonstrando eficácia protetora contra as gastroenterites graves causadas por RV. O Brasil e o México, após introduzir a vacina RVA apresentaram declínio substancial, ressaltando o potencial destas vacinas para salvar vidas (DESAI et al., 2011; LINHARES; VILLA, 2006; TATE et al., 2012).

Três estudos conduzidos no Brasil e no México registraram redução na mortalidade por gastroenterite entre crianças menores de cinco anos de idade na era pós-vacina da ordem de 22-41%, correspondendo a reduções de aproximadamente 700 e 1.30 óbitos anuais no México e no Brasil, respectivamente (DO CARMO et al., 2011; LANZIERI et al., 2011; RICHARDSON et al., 2010).

Com o estabelecimento dos programas universais de vacinação contra o RV, um novo cenário emergiu em relação à saúde pública no Brasil. Tem-se observado que houve um deslocamento no pico de incidência de RV de junho-agosto para setembro. Além disso, os RV foram detectados com menor frequência entre crianças ≤ 5 anos (19,5%) quando comparado às crianças com mais idade e adolescentes de 6-18 anos (40,6%). A distribuição genotípica mostrou ainda um perfil diferente a cada ano: a cepa G2P[4] foi a mais prevalente durante os anos de 2007-2010, G9P[8] em 2011 e G12P[8] em 2012. Além disso, infecções mistas (G1+G2P[4], G2+G3P[4]+P[8], G2+G12P[8]), combinações não usuais (G1P[4], G2P[6]) e cepas atípicas (G3P[3]) também foram identificadas. Portanto, a tendência dos RV em

infectar crianças mais velhas e adolescentes após a implementação da vacina tem sido relatada em todo o mundo (LUCBS et al., 2015). No Brasil, a possibilidade de seleção para um de um imunizante devido à vacinação em massa do RV tem sido sugerido, embora ainda existam debates em curso sobre possíveis diferenças genóticas após a introdução da VORH (GURGEL et al., 2014).

Estudo conduzido em Belém, Brasil por, Justino et al. (2011) demonstrou a eficácia de duas doses da VORH para evitar a hospitalização de crianças com gastroenterite grave, causada pelo genótipo G2P[4], foi de 75,8% (IC 95%: 58,1-86,0) para indivíduos controles da vizinhança e de 40% (IC 95%: 14,2-58,1) para controles hospitalares. Neste estudo, as crianças menores de três anos de idade mostraram uma considerável redução na proporção de hospitalizações graves atribuídas ao RV.

Embora tais vacinas tenham sido implantadas em vários países do mundo, existe uma escassez de estudos de custo efetividade dos programas de vacinação para RV e isso representa uma preocupação quanto a execução destes em países da Europa e da América do Norte (BRUIJNING-VERHAGEN; QUACH; BONTEN, 2012).

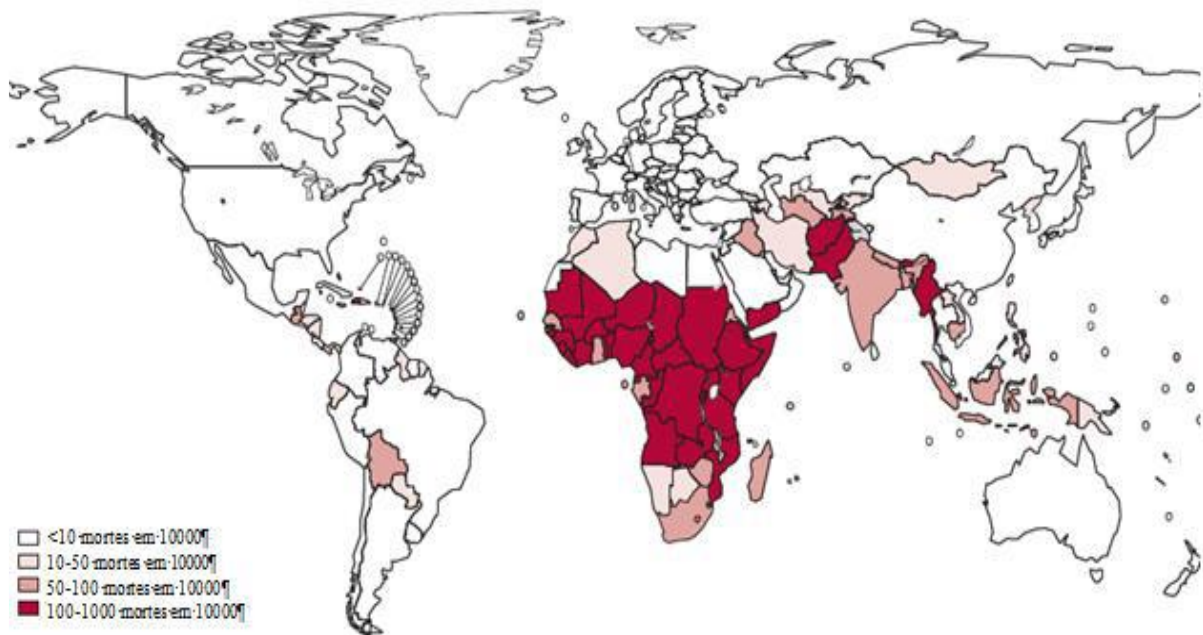
Embora tenha se registrado uma redução nos índices de hospitalização dos casos de gastroenterite aguda após a introdução da vacina contra RVA no Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil no ano de 2006, verificou-se que esta situação ainda se mantém expressiva, pelo fato de que alguns municípios brasileiros registram menor cobertura vacinal (LANZIERI et al., 2011). Portanto, o monitoramento constante das cepas de RV circulantes é de extrema importância, uma vez que os genótipos emergentes podem surgir como mecanismo de escape vacinal (DÓRÓ et al., 2014; MORILLO et al., 2010).

2.2.9 Epidemiologia do vírus

Segundo Patton, (2012), quase todas as crianças com até cinco anos de idade serão infectadas por RV, pelo menos uma vez, independentemente da condição sócio-econômica e do país de origem. A morbidade causada por RV em crianças é semelhante tanto nos países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Nos países em desenvolvimento, a mortalidade de crianças é maior, provavelmente devido a fatores incluindo o abandono precoce do aleitamento materno, baixo nível educacional e más condições higiênico-sanitárias, em decorrência das precárias condições de saneamento básico. Associado a isso, o crescimento

populacional que, na maioria das vezes não é acompanhado da melhoria das condições de vida da população, contribui substancialmente para o agravamento deste problema conforme demonstrado na figura 7 (PODEWILS et al., 2004).

Figura 7- Países que registram mortalidade por RV em crianças menores de cinco anos de idade



Fonte: Adaptada de Tate et al., 2012.

A infecção causada por RV em geral exibe um padrão sazonal variando desde os climas temperados, em que a infecção se estabelece nos meses mais frios, até os climas tropicais, em que a infecção ocorre durante todo o ano, com maior prevalência durante a estação mais seca (ARAÚJO et al., 2010; BERNSTEIN, 2009; LINHARES; ARAUJO; JUSTINO, 2013; MBUH et al., 2013).

Durante as últimas três décadas, tem-se observado uma grande diversidade genômica e antigênica causada pelos RV. Os tipos G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], e mais recentemente os genótipos G9P[8] e G12P[8] têm sido registrados co-circulando em frequências de 80-90% se consideradas todas as infecções causadas por RV na América do Norte e Europa (BÁNYAI et al., 2012; ITURRIZA-GÓMARA et al., 2011; MARQUES et al., 2011).

Já nos países da África, Ásia e América do Sul os genótipos mais prevalentes são o G5, G6, G8 e G9 (KANG et al., 2013; LUCHS; TIMENETSKY, 2014; MARQUES et al.,

2011). Uma variedade de genótipos, se não todos, podem co-circular criando condições favoráveis para a formação de vírus recombinantes (PAYNE et al., 2009; WHO, 2011).

Diversas pesquisas conduzidas no Brasil no período após a introdução da vacina indicaram uma predominância do genótipo G2P[4] nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil levantando-se a hipótese de que a vacina estaria causando uma pressão seletiva (GURGEL et al., 2008). Contudo, esta elevada prevalência do G2 provavelmente esteja refletida no padrão cíclico de ocorrência deste genótipo no Brasil bem como em outros países do mundo (LINHARES; VELÁZQUEZ, 2008).

O primeiro genótipo G12 foi identificado nas Filipinas, em 1987 em crianças com diarreia aguda, (TANIGUCHI et al., 1990). No Brasil, este tipo em combinação com o P[9] e o P[6] foi descritos nas regiões Sul (2003) e Norte (2008-2010), respectivamente (PIETRUCHINSKI et al., 2006; SOARES et al., 2012). Nos últimos dez anos o genótipo G12 emergiu em escala global, predominando em combinação com tipos P[6] ou P[8] e menos frequentemente com os tipos P[4] e P[9], assumindo o sexto genótipo associado a infecções que acometem seres humanos (MATTHIJNSSENS et al., 2010; RAHMAN et al., 2007). A completa caracterização do genoma do RV G12 é importante e ampliará a compreensão sobre a sua evolução e o possível impacto no desenvolvimento de vacinas (SOARES et al., 2012).

A introdução da vacina contra o RV na América Latina levou a um significativo impacto da gastroenterite grave. Nos países de renda média da América Latina tais como México, Brasil, El Salvador e Panamá, a vacina contribuiu para a redução de 17-51% nos índices de hospitalização associada às gastroenterites e na redução de 59-81% nas taxas de hospitalização entre aquelas crianças menores de cinco anos de idade. No que diz respeito a redução da mortalidade associada à gastroenterite a taxa foi de 22-41% (DESAI et al., 2011).

A Vigilância Epidemiológica para o rotavírus no Brasil foi estruturada em um modelo de Vigilância Sentinela, no qual, foi recomendada a criação de uma Unidade hospitalar Sentinela por estado, onde os casos são resultantes da demanda espontânea por atendimento médico nessas unidades. Os dados registrados servirão de base para o levantamento das características epidemiológicas e virológicas do rotavírus e a determinação das estimativas de carga da doença nas populações sob vigilância. Adicionalmente, subsidiarão as decisões políticas de vacinação contra o rotavírus (OLIVEIRA, 2011). Desta forma, e visando atender aos objetivos propostos para a vigilância epidemiológica deste agravo foi implantada no ano de 2006 no Estado do Amapá a Rede Sentinela hospitalar de rotavírus.

Segundo a Coordenadoria de Vigilância em Saúde do Estado do Amapá (CVS/SESA) a cobertura vacinal para o RVA tem sido homogênea nos últimos cinco anos alcançando

aproximadamente 70,92%, portanto, abaixo da cobertura preconizada pelo Ministério da Saúde (MS) para o esquema básico de vacinação para menores de 1 ano de idade que é de 95% (GUIMARÃES; ALVES; TAVARES, 2009).

2.3.0 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial dos RV se constitui numa importante ferramenta visando o seu preciso diagnóstico e controle. Nesse contexto, a utilização de testes laboratoriais sensíveis e específicos visando à confirmação de um quadro clínico suspeito é de extrema importância. Tais exames devem ser realizados durante a fase aguda da doença que compreende o período dos primeiros sintomas, possibilitando assim um diagnóstico mais rápido (OLIVEIRA et al., 2007).

A microscopia eletrônica (ME) foi o método pioneiro utilizado para o diagnóstico de RV. Tal metodologia permite a visualização das partículas virais nas fezes, e apresenta elevada especificidade em razão da morfologia distinta que este vírus apresenta. Esta técnica não é mais tão utilizada por necessitar de profissionais qualificados e equipamentos de custo muito elevado (ESTES; GREENBERG, 2013).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) é considerado o padrão ouro para a detecção do antígeno de RV visando à detecção de antígeno de RVA nas fezes. Tal metodologia encontra-se disponível em kits comerciais para os quais utilizam anticorpos policlonais ou monoclonais que são dirigidos ao antígeno comum de grupo, o VP6, procedimento este de fácil execução. Existem ainda outros métodos diagnósticos que também são utilizados, já que possuem boa sensibilidade e especificidade, como os testes imunocromatográficos que são rápidos e se baseiam na detecção qualitativa de antígenos virais em amostras de fezes (LINHARES; ARAUJO; JUSTINO, 2013; OLIVEIRA et al., 2007).

A Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA) é uma técnica que exhibe elevada especificidade e permite a visualização dos perfis genômicos de todos os grupos de RV. Tais padrões eletroforéticos são classificados com base na migração dos segmentos genômicos 10 e 11, sendo classificados em longo, curto ou super curto (ESTES; GREENBERG, 2013). A diversidade dos eletroferotipos de rotavírus após análise dos 11 segmentos gênicos pode eventualmente evidenciar recombinações (ou permutas) que dão origem a padrões não usuais, como já observados na Amazônia por Mascarenhas et al. (1997).

A genotipagem de RV é realizada pela reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR), seguida pela seminested PCR com o uso de iniciadores específicos (GENTSCH et al., 1992; GOUVEA et al., 1990). Esta metodologia exibe alta sensibilidade e especificidade e se fundamenta na amplificação enzimática dos genes, utilizando-se iniciadores ou *primers* consensuais específicos. Pelo fato dos RV, terem seu material genético constituído por ácido ribonucléico é necessária a conversão do RNA em DNA complementar (cDNA) por meio de uma enzima de transcrição reversa para posterior amplificação com o uso de iniciadores específicos (LINHARES; ARAUJO; JUSTINO, 2013). Tal técnica se tornou o padrão-ouro no diagnóstico dos RV (DESSELBERGER, 2014).

Outra técnica bastante utilizada atualmente é a RT-PCR quantitativa (RT-qPCR) que é uma variação da RT-PCR a qual permite aumentar a detecção do RNA, além de quantificar a carga viral durante uma infecção (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004).

3 JUSTIFICATIVA

Na Amazônia brasileira, vários estudos já foram conduzidos objetivando o esclarecimento do agente etiológico da DDA como vírus, bactérias e parasitas. Contudo, muitos casos de diarreia ainda continuam sem uma etiologia definida. Assim, as elucidações das diarreias virais apresentam certas dificuldades no que diz respeito ao diagnóstico, pois exigem técnicas mais sensíveis e específicas, uma infraestrutura laboratorial adequada e técnicos qualificados, que não estão ao alcance da grande maioria dos municípios da região.

O RV é a maior causa de diarreia em crianças menores de 5 anos no Brasil. Dados da Vigilância em Saúde relativos a DDA no Estado do Amapá demonstram que embora tenham sido notificados 97.222 casos de DDA neste estado no período de 2007 a 2010, o recebimento de espécimes fecais para o esclarecimento diagnóstico dos RV ainda é baixo em razão do número insuficiente de amostras fecais colhidas. Dessa forma, o conhecimento da prevalência das gastroenterites virais causadas por RV baseado em um estudo clínico-laboratorial fundamentado que defina a etiologia e o comportamento desse agravo na população infantil abaixo de cinco anos é fundamental para a construção de indicadores epidemiológicos, possibilitando assim a implementação de políticas públicas que contemplem essa população.

O estado do Amapá implantou em 2006 a Rede Sentinela hospitalar do rotavírus, proposta pelo Ministério da Saúde, que possibilitaria assim, traçar as características epidemiológicas e virológicas do rotavírus e a determinação da estimativa de carga da doença nas populações sob vigilância. Contudo, as dificuldades enfrentadas na implementação dessa medida de saúde pública, evidenciam a necessidade de fortalecimento da rede sentinela do rotavírus no estado do Amapá. Some-se a isso, a necessidade de se estabelecer no LACEN, AP, uma metodologia para a identificação dos genótipos circulantes no estado do Amapá, imprescindível para a vigilância epidemiológica dos RV após a introdução da vacina.

O Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá (LACEN-AP) enfrenta problemas no que diz respeito a elucidação dos casos suspeitos de RV devido ao Núcleo de Vigilância Epidemiológicas das unidades hospitalares sentinelas não realizarem devidamente o preenchimento da ficha epidemiológica do paciente e conseqüentemente, a não colheita do espécime fecal ocasionando uma não conformidade para o envio posterior das amostras fecais ao Instituto Evandro Chagas (IEC) que atua como laboratório de referência, ficando desse modo sem dados sobre os genótipos de rotavírus circulantes no Estado. Considerando o contexto apresentado, o presente estudo propôs readequações e implementações no fluxo de envio de amostras para o LACEN-AP.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer metodologia para identificação dos genótipos G e P de RV, no LACEN, AP.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar os grupos, eletroferotipos e genótipos G e P de rotavírus em crianças de Macapá, Amapá;
- b) Determinar a frequência, distribuição etária e temporal das infecções causadas por rotavírus em crianças com e sem diarreia;
- c) Comparar os genótipos circulantes com o estado vacinal;
- d) Comparar o quadro clínico apresentado pelos menores com os genótipos circulantes na região.
- e) Elaborar Procedimento Operacional Padrão modelo para as redes sentinelas do RV com instruções para a colheita, processamento, armazenamento e transporte do espécime clínico.
- f) Elaborar Procedimento Operacional Padrão para realização dos testes moleculares para detecção e genotipagem do RV em amostras fecais humanas.
- e) Auxiliar o serviço de vigilância em saúde para doenças diarreicas causadas por RV em crianças de 0 a 5 anos no município de Macapá, Amapá.

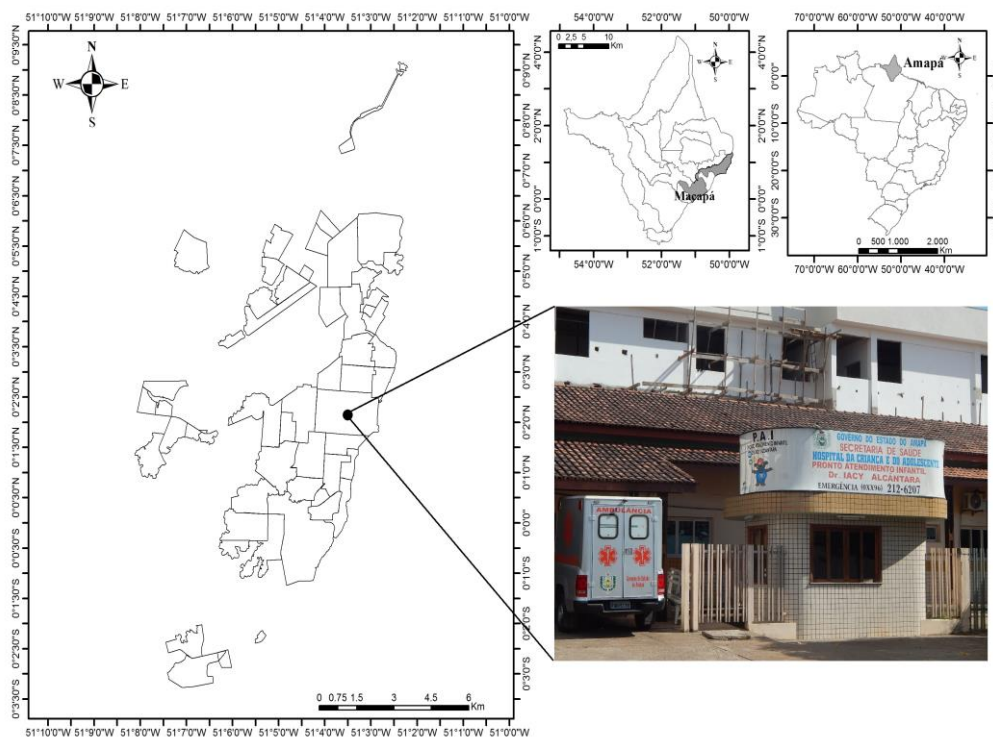
5 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo é do tipo analítico observacional, transversal e integrante de uma investigação epidemiológica e molecular que abrange o Hospital da Criança, a Unidade de Pronto Atendimento Infantil (PAI).

5.1 ÁREA DE ESTUDO

O Estado do Amapá encontra-se localizado na região Norte do Brasil e possui 16 municípios conforme demonstrado na figura 8. Segundo o censo de 2010, a população estimada no estado em 2013 foi de aproximadamente 734.996 habitantes, com 142.828.521 km² de extensão territorial e densidade demográfica de 4,69 habitantes/km². Tem Macapá como sua capital, a qual representa o centro econômico, cultural e administrativo do Estado, com uma população estimada em 2013 de 437.256 habitantes, com 6.408.545 km² de extensão territorial e densidade demográfica de 62,14 habitantes/km² (IBGE, 2011).

Figura 8 - Mapa do Estado do Amapá.



Fonte: Arquivo elaborado-por Dr. Fred Monteiro, 2015.

5.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

O estudo envolveu 161 amostras fecais de crianças com até cinco anos de idade com ou sem gastroenterite aguda (135 amostras provenientes de crianças com gastroenterite aguda – grupo diarreico e 26 espécimes provenientes de crianças assintomáticas para diarreia – grupo não diarreico ou controle) definida como a presença de diarreia com três ou mais evacuações líquidas ou semi-líquidas num período de 24 horas, acompanhada ou não de febre e vômitos. As amostras de fezes foram colhidas, na proporção de seis crianças diarreicas para uma criança não diarreica. O pareamento foi formado por crianças de 0 a 5 anos atendidas por outras causas (sem diarreia) no Hospital da Criança do Estado do Amapá, no ambulatório da Unidade de Pronto Atendimento Infantil (PAI), situado no centro de Macapá (figura 8).

A participação das crianças no estudo foi condicionada a permissão dos seus responsáveis, mediante o conhecimento dos objetivos do estudo e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), reunidos no APÊNDICE A.

5.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Ter idade entre 0 a 5 anos e apresentar quadro de DDA (grupo diarreico);
- Ter idade entre 0 a 5 anos e não apresentar quadro de DDA (grupo controle);
- Ser residente no Estado do Amapá;
- Ter o TCLE assinado pelos pais ou responsáveis legais.

5.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Não assinatura do TCLE pelo responsável;
- Crianças com idades acima de 5 anos;
- Não ser residente no Estado do Amapá;

5.5. MATERIAL

Durante o atendimento ambulatorial e hospitalar foi realizado a colheita dos espécimes fecais em frascos estéreis. Os espécimes fecais foram colhidos no Hospital da Criança e na Unidade de Pronto Atendimento Infantil (PAI). O estudo foi desenvolvido em parceria com o LACEN-AP e Instituto Evandro Chagas (IEC) em Belém, Pará. Durante este período foram colhidas amostras de fezes acompanhadas das fichas clínico epidemiológicas de crianças com idade de até cinco anos (APÊNDICE B).

Os resultados dos exames foram entregues aos participantes em até 48 horas após a colheita das amostras. O restante do material fecal foi congelado a - 20°C e posteriormente analisado no Laboratório de Virologia do IEC/PA, onde foram realizados os testes moleculares para identificação genética do RV.

5.6 MÉTODOS

5.6.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígeno de RVA

Para o ensaio de ELISA nas amostras fecais dos pacientes empregou-se o kit RIDASCREEN (R-BIOPHARM AG-Alemanha), que utiliza placa de microtitulação com orifícios revestidos por anticorpos monoclonais contra RVA. Como controle positivo foi usado antígeno de RV recombinados; prontos para uso. O kit possui dois conjugados: Conjugado 1: Anticorpos conjugados em biotina contra RV em solução protéica estabilizada. Conjugado 2: Conjugado de poli-estreptavidina-peroxidase em solução protéica estabilizada. O diluente de amostras é composto por solução de cloreto de sódio (NaCl) tamponado de proteína e o tampão de lavagem (WASH), por solução de NaCl tamponado de fosfato (concentração de 10X); contendo 0,1% de thimerosal; Substrato: Peróxido de hidrogênio /TMB e o reagente bloqueador da reação (STOP) que é o ácido sulfúrico 1N.

As amostras fecais foram previamente diluídas e pipetadas em volume de 100µL nos orifícios da placa, acrescentando-se em seguida 100µL de controle positivo e 100µL de controle negativo. Após a adição dos controles e amostras na placa acrescentou-se 100µL do conjugado 1 em todos os orifícios da placa e incubou-se por 60 minutos em campo escuro e

em temperatura ambiente (20 a 25 graus). Após o intervalo lavou-se a placa em lavadora automática ou manual com pipeta multicanal por 5 vezes e acrescentou-se 100µL do conjugado 2 em todos os orifícios seguido de incubação em campo escuro por 30 minutos em temperatura ambiente (20 a 25 graus). Após essa incubação lavou-se a placa em lavadora automática por 5 vezes e acrescentou-se em todos os orifícios da placa 100µL do substrato, seguido de incubação por 15 minutos em campo escuro e em temperatura ambiente (20 a 25 graus). Após esta última etapa pipetou-se 50µL de reagente bloqueador em todos os orifícios interrompendo-se a reação. A densidade ótica foi medida em aparelho fotométrico equipado com filtro de 450nm.

Todas as amostras positivas por ELISA foram submetidas às técnicas moleculares após treinamento realizado no Instituto Evandro Chagas descritas a seguir:

5.6.2 Preparo da suspensão fecal

As suspensões fecais foram preparadas a 10% em tampão Tris-Ca⁺⁺ 0,01M pH 7,2, homogeneizadas e centrifugadas a 2.370 gravidade (Xg) durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi colhido e estocado a -20° C.

5.6.3 Extração do genoma viral

Segundo protocolo descrito por Boom et al. (1990), a extração do ácido nucleico consiste na adição de 300 µL de suspensão fecal, 20µL de proteinase K e 800µL de tampão L6. O produto foi homogeneizado e incubado a 56°C por 10 minutos seguido da adição de 200µL de etanol absoluto, 20µL de sílica e homogeneizado e centrifugado a 18.620 Xg, descartando o sobrenadante em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 10N. Posteriormente, foram realizadas sucessivas lavagens em tampão L2, etanol 70% gelado e acetona gelada com o sobrenadante sendo desprezado e o sedimento incubado em banho-maria à 56°C por 15 minutos. Ao dsRNA puro, foi adicionado 60µL de água livre de RNase, incubação em banho-maria a 56°C por 15 minutos, homogeneização e centrifugação, seguido da colheita do sobrenadante em tubos estéreis os quais foram posteriormente armazenados à 20°C.

Durante o processo de extração, todas as medidas de controle de contaminação foram realizadas, inclusive com a utilização de controle positivo (amostra sabidamente positiva para rotavírus) e negativo (água ultra pura).

5.6.4 Determinação dos eletroferotipos por EGPA

A caracterização do grupo e eletroferotipos de RVA foi realizada de acordo com a técnica descrita por Pereira et al.(1983). A corrida eletroforética foi conduzida em campo elétrico de 100 Volts (V), 21milli-Ámperes (mA) e 100 Watts (W) durante duas horas. Posteriormente, foi realizada a fixação do dsRNA com etanol e ácido acético absolutos, seguido de coloração com nitrato de prata e revelação com hidróxido de sódio e formaldeído. Após o aparecimento dos segmentos de dsRNA, o revelador foi desprezado e foi adicionado o etanol para interromper a reação seguido da visualização do perfil eletroforético do RV realizada em negatoscópio de luz branca (HERRING et al., 1982).

5.6.5 Reação em cadeia pela polimerase, precedida de transcrição Reversa (RT-PCR)

Esta técnica foi desenvolvida em duas etapas segundo protocolo descrito por Gentsch et al. (1992) e Gouvea et al. (1990). O material genético do RV é constituído por RNA foi necessária a produção de um cDNA por meio de transcrição reversa empregando-se pares de iniciadores para o tipo G de rotavírus humano (Beg9 e End9) e para o tipo P (4con3 e 4con2) como mostra o Quadro 2, visando amplificar fragmentos de 1062 pb e 875 pb para os genes VP7 e VP4, respectivamente. Os iniciadores foram desnaturados a 97°C em termociclador por 5 minutos, seguido de imersão em banho de gelo (0°C) por 5 minutos. Após desnaturação, foi adicionada uma primeira mistura contendo a Transcriptase Reversa (RT) conforme demonstrado no Quadro 3, a qual foi incubada em termociclador durante 1 hora a 42°C, visando à obtenção do cDNA.

Quadro 2 - Iniciadores utilizados na RT-PCR para os genes VP7 e VP4 de RV.

Iniciador	Sequência(5'→3')	Gene	(pb)*	Referência
Beg 9 (-)	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	VP7	-	Gouvea et al. (1990)
End 9 (+)	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	VP7	1062	Gouvea et al. (1990)
4con 3 (+)	TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A	VP4	-	
4con 2 (-)	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	VP4	875	Gentsch et al. (1992)
				Gentsch et al. (1992)

Fonte: (AUTOR, 2015)

Quadro 3 -Reagentes necessários para realização da RT-PCR

REAGENTES	RT	TAQ
	Por reação em µL	Por reação em µL
Produto da extração	2	-
dNTP 2,5mM	1	1
Tampão 10X sem Mg	2,5	2,5
MgCl ₂ 50mM	1	1
RT 20 U/µL	0,25	-
Taq DNA polimerase 5 U/µL	-	0,25
ÁguaDNase/RNasefree q.s.p.	17,25	20,25

Fonte: (AUTOR, 2015)

Após a obtenção do cDNA, foi adicionado a cada tubo 20,25 µL da segunda mistura contendo a Taq DNA polimerase (TAQ) conforme o Quadro 3. Em seguida, os tubos foram colocados no termociclador de acordo com o programa específico para RT-PCR sob as seguintes condições:

94°C por 2 minutos	}	1 ciclo ⇒ Desnaturação inicial
94°C por 30 segundos		
42°C por 30 segundos	}	35 ciclos de amplificação
72°C por 1 minuto		
72°C por 10 minutos	}	1 ciclo ⇒ Extensão final
4°C	}	Armazenamento do produto

5.6.6 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da RT-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com *Sybe Safe*, juntamente com o marcador de peso molecular e submetidas a um campo elétrico (120V e 400mA) durante 20 minutos. Os amplicons apresentando diferentes tamanhos foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta e fotografados em um aparelho de foto documentação de gel (VilberLourmat). Por fim, os produtos da RT-PCR foram armazenados a -20°C.

5.6.7 Semi Nested-PCR

Esta técnica foi realizada para genotipagem do RV, na qual uma segunda etapa de amplificação foi empregada com um mesmo iniciador utilizado na RT-PCR, além de iniciadores internos do gene a ser amplificado, visando aumentar a sensibilidade e especificidade do método (GENTSCH et al., 1992). Uma alíquota do produto do primeiro ciclo de amplificação (RT-PCR) foi submetida a um segundo ciclo de amplificação, agora utilizando outros iniciadores que definiram os genótipos G e P. Os reagentes utilizados nesta etapa constam no Quadro 4. O programa específico para a realização da técnica foi de acordo com as seguintes condições:

94°C por 2 minutos	} 1 ciclo ⇒ Desnaturação inicial
94°C por 30 segundos	} 30 ciclos de amplificação
50°C por 30 segundos	
72°C por 1 minuto	
72°C por 10 minutos	} 1 ciclo ⇒ Extensão final
4°C	} Armazenamento do produto

Quadro 4 -Reagentes necessários para realização da SEMI NESTED-PCR .

REAGENTES	Por reação em μL
Produto da PCR	2
dNTP 2,5mM	2
Tampão 10X sem Mg	2,5
MgCl ₂ 50Mm	1
Primers específicos tipo G ou P(RVG9, 4con3)	1
Pool G (G1-G4, G9 e G12)	1
Pool P (P[4], P[6], P[8] e P[9])	1
Taq DNA polimerase 5 U/ μL	0.25
ÁguaDNase/RNase <i>freeq.s.p.</i>	15,25

Fonte: (AUTOR, 2015)

Quadro 5 - Tamanho dos fragmentos de amplificação dos tipos G e P de RVA. .

Tipo	Gene	Amplificação em pares de base (pb)	Referência
G1	VP7	749	Gouvea et al., (1990)
G2	VP7	652	Gouvea et al., (1990)
G3	VP7	374	Gouvea et al., (1990)
G4	VP7	583	Gouvea et al., (1990)
G9	VP7	306	Gouvea et al., (1990)
G12	VP7	515	Banerjee (2007)
P[4]	VP4	483	Gentsch et al., (1992)
P[6]	VP4	267	Gentsch et al., (1992)
P[8]	VP4	345	Iturriza-Gómara., (2000)
P[9]	VP4	391	Gentsch et al., (1992)

Fonte: (AUTOR, 2015)

5.6.8 Aspectos éticos e de biossegurança

Os espécimes clínicos e as fichas clínico-epidemiológicas dos sujeitos incluídos no estudo são oriundos do projeto intitulado: “IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE GENOTIPAGEM PARA A DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE ROTAVÍRUS TIPO A CIRCULANTES EM CRIANÇAS NO AMAPÁ EM APOIO A VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/IOC seguindo a Resolução CNS 466/2012 e a Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, tendo recebido parecer de aprovação de nº 922.408 (ANEXO A).

Em relação aos aspectos de biossegurança, no decorrer dos procedimentos foram utilizados Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) e todo material potencialmente contaminado foi manipulado em laboratório de segurança NB2 com o uso de cabine de fluxo laminar tipo 2.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

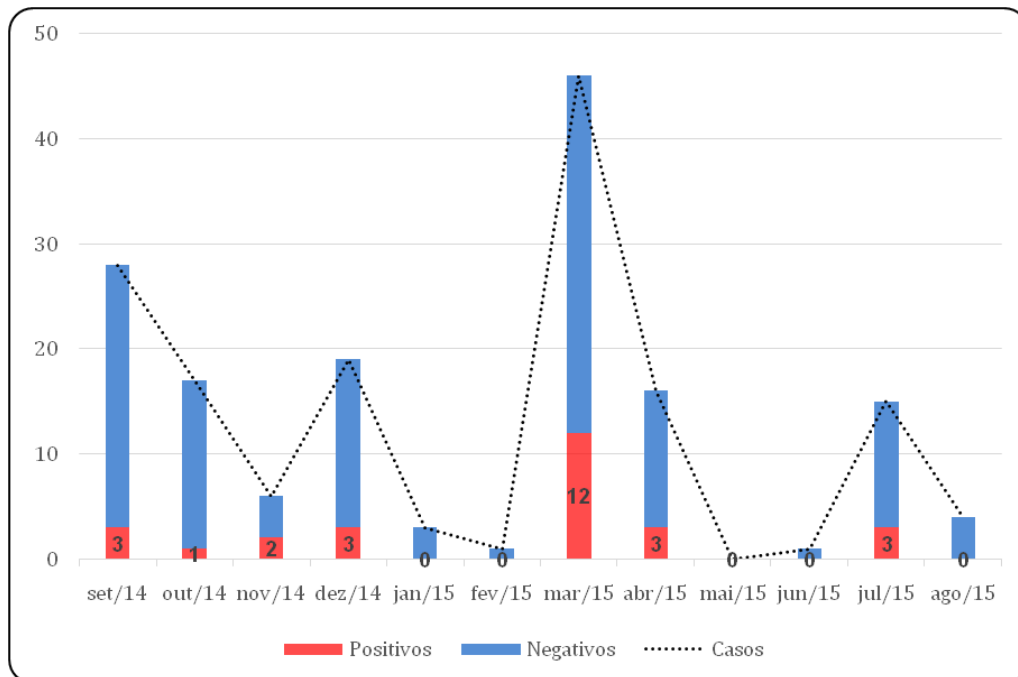
Os dados, processados em banco de dados criado pelo software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) para Windows versão 20.0 (nível de significância do estudo de 5%), foram submetidos a análise descritiva para obtenção das frequências absoluta e relativa das variáveis analisadas, e da prevalência dos desfechos investigados. Na análise bivariada, verificou-se a associação entre cada uma das variáveis independentes e com a variável dependente, pelo teste qui-quadrado (χ^2).

As variáveis pesquisadas foram dicotomizadas para se obter a razão de prevalência bruta (RP bruta). Na análise multivariada, utilizou-se a regressão de Poisson para a análise das variáveis independentes associadas ao desfecho, controladas por possíveis fatores de confusão (RP ajustada). Nesta etapa, foi aplicado o programa STATA 12.0.

6 RESULTADOS

No período de 2014 a 2015, 161 espécimes fecais foram colhidos a partir de crianças menores de cinco anos de idade residentes no Estado do Amapá, participantes do presente estudo. A positividade para RVA foi de 18,6% (30/161) com o uso do EIE/Ridascreen®. Das 161 crianças participantes, 135 eram diarreicas, as quais apresentaram 22,2% (30/135) de positividade para RVA sendo que o maior número de casos ocorreu no mês de março. Já entre as 26 crianças não diarreicas não houve registro de positividade para RVA (figura 9).

Figura 9 – Distribuição temporal de Rotavírus no período de 2014-2015. Macapá, Estado do Amapá, Brasil.



Fonte: (AUTOR, 2015)

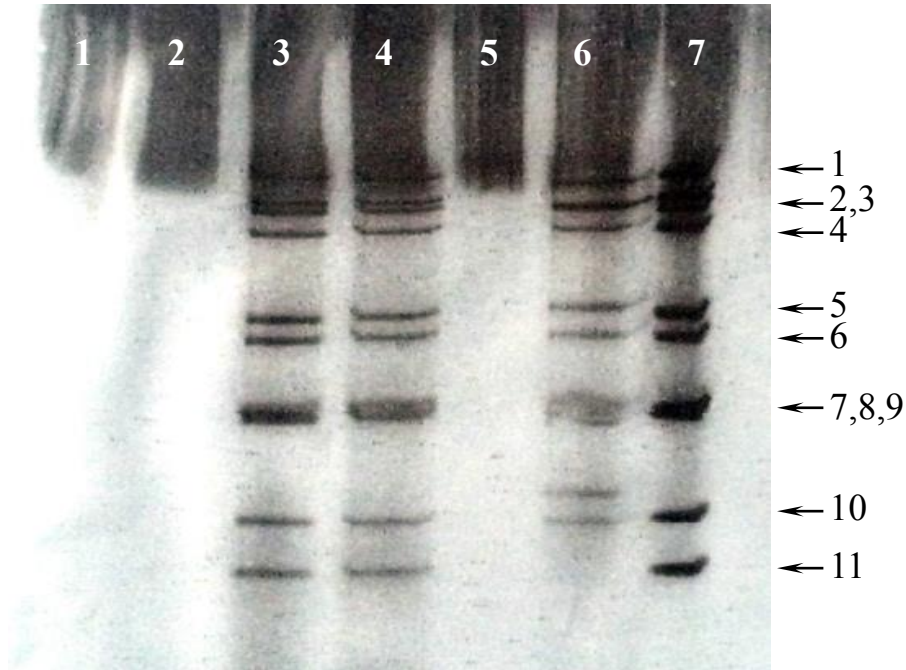
6.1 ANÁLISE MOLECULAR

6.1.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)

Todos os espécimes fecais positivos para RVA por ELISA foram submetidos à EGPA. Por esta metodologia foi possível se identificar os eletroferotipos de RV em 60%

(18/30) dos casos com a identificação somente do eletroferotipo longo. Em 40% (12/30) das amostras não foi possível se identificar o eletroferotipo circulante (Figura 10).

Figura 10 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA) em amostras de rotavírus evidenciando o padrão eletroforético longo e curto.



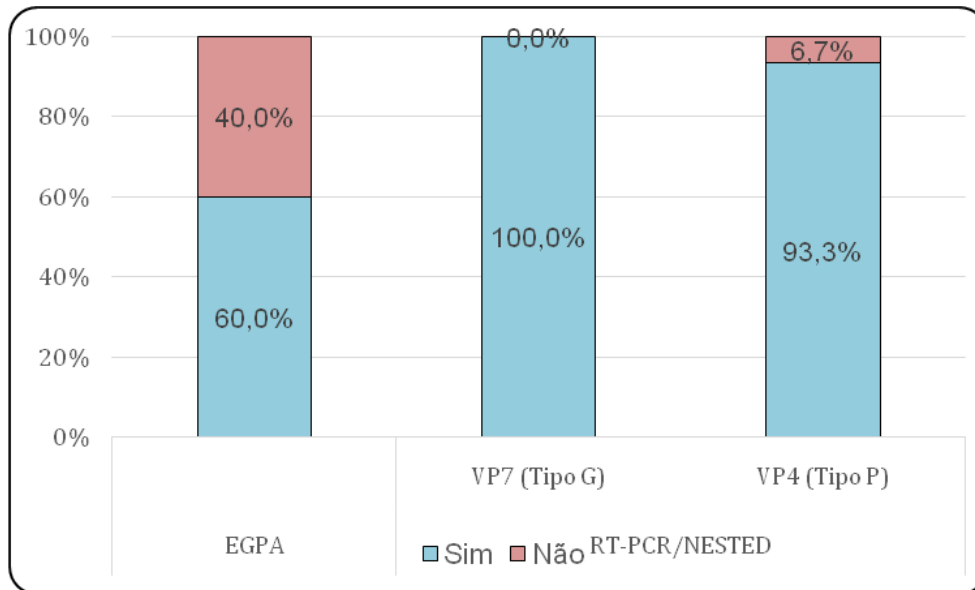
Colunas 1, 2 e 5 – amostras positivas em que não foi possível a visualização do perfil eletroforético dos RV; Colunas 3 e 4 – amostras positivas com perfil eletroforético longo; 6 – controle de perfil curto; 7 – controle de perfil longo.

Fonte: (AUTOR, 2015).

6.1.2 Genótipos G e P de RVA

Todas as amostras positivas para RVA foram submetidas à RT-PCR e seminested-PCR para genotipagem do RVA com identificação do genótipo emergente G12 em 100% (30/30) das amostras. Com relação ao gene VP4, o genótipo P[8] foi identificado em 93,3% (28/30) dos espécimes analisados enquanto que em 6,7% (2/30) dos casos não foi possível se identificar o genótipo circulante. No que diz respeito à combinação binária envolvendo os genótipos G e P, em apenas dois espécimes não foi possível se identificar a combinação (Figura 11).

Figura 11 – Diagnóstico molecular das amostras positivas para Rotavírus. Macapá, Estado do Amapá, Brasil.



Fonte: (AUTOR, 2015).

6.2 VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS E OS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE GASTRENERITE POR RVA

Cento e sessenta e uma crianças, diarreicas e não diarreicas com idade inferior a cinco anos participaram do estudo, sendo a positividade para RVA de 18,2% (30/161) somente para o grupo diarreico. A análise bivariada da tríade clássica, demonstrou associação entre a diarreia e a infecção por RVA somente nas crianças diarreicas as quais expressaram positividade para RVA como uma das manifestações clínicas da infecção apresentando p valor <0,008 (100%; 30/30). Além da diarreia, o vômito e a febre assumiram a maior frequência entre os achados clínicos estando associados a 80,0% (24/30) e a 60,0% (18/30) dos casos, respectivamente.

Das crianças que apresentaram diarreia, 43,3% (13/30) associaram febre e vômito ao quadro clínico viral e 3,3% (1/30) registraram a diarreia de forma isolada. Demonstrando a associação entre a tríade clássica e a infecção por RVA (p < 0,05).

Tabela 1 - Infecção por rotavírus segundo características clínicas apresentadas pelas crianças hospitalizadas. Macapá, Estado do Amapá, Brasil, 2014-2015.

Variáveis	Infecção por Rotavírus						p
	Sim		Não		Total		
	n	%	N	%	N	%	
Diarreia							
Sim	30	100,0	105	80,2	135	83,9	0,008
Não	0	0,0	26	19,8	26	16,1	
Febre							
Sim	18	60,0	79	60,3	97	60,2	0,975
Não	12	40,0	52	39,7	64	39,8	
Vômito							
Sim	24	80,0	78	59,5	102	63,4	0,036
Não	6	20,0	53	40,5	59	36,6	
Total	30	100,0	131	100,0	161	100,0	-----

Fonte: (AUTOR, 2015)

No que diz respeito à idade e sexo, 83,3% (25/30) das crianças que desenvolveram infecção por RVA se situavam na faixa etária entre 6 e 24 meses e a idade média de 17,5 (mais ou menos 14,6 meses) sendo 63,3% do sexo masculino. No que tange a variável renda familiar, 63,3% (19/30) dos participantes recebiam até 1 salário mínimo com no valor de R\$ 788,00(reais) estipulado pelo Ministério do Trabalho e Emprego para o ano do estudo. Vale ressaltar que nenhuma destas variáveis apresentou-se associação estatisticamente significativa (Tabela 2).

Tabela 2- Características demográficas relacionadas com a infecção por rotavírus em crianças hospitalizadas. Macapá, Estado do Amapá, Brasil, 2014-2015.

Variáveis	Infecção por Rotavírus						p
	Sim		Não		Total		
	n	%	N	%	N	%	
Faixa etária							
<6 meses	1	3,3	16	12,2	17	10,6	0,357
6 a 24 meses	25	83,3	98	74,8	123	76,4	
>24 meses	4	13,3	17	13,0	21	13,0	
Sexo							
Feminino	11	36,7	61	46,6	72	44,7	0,325
Masculino	19	63,3	70	53,4	89	55,3	
Renda Familiar							
Sem renda	4	13,3	29	22,1	33	20,5	0,244
Até 1 salário mínimo	19	63,3	61	46,6	80	49,7	
1 até 3 salários mínimo	7	23,3	41	31,3	48	29,8	
Total	30	100.0	131	100.0	161	100.0	-----

Fonte: (AUTOR, 2015)

O Aleitamento Materno Exclusivo foi registrado durante os primeiros meses de vida em 80,0% (24/30) das crianças infectadas por RVA, enquanto que 20,0% (6/30) das crianças não realizaram essa prática, não havendo diferença estatisticamente significativa com o grupo de crianças não infectadas.

Com relação ao quadro vacinal, houve associação significativa entre a infecção por RVA e o número de doses da VORH recebidas ($p < 0,05$), pois entre as crianças que tiveram infecção 46,7% (14/30) não tomaram nenhuma dose, e 23,3% (7/30) não completaram o esquema vacinal. Já das crianças sem infecção, 57,7% (75/131) tinham registro das duas doses da vacina (Tabela 3).

Tabela 3 - Infecção por rotavírus segundo ocorrência de aleitamento materno exclusivo, vacinação para rotavírus e a quantidade de suas doses em crianças hospitalizadas. Macapá, Estado do Amapá, Brasil, 2014-2015.

Variáveis	Infecção por Rotavírus				Total		p
	Sim		Não		N	%	
	n	%	N	%			
Aleitamento Materno Exclusivo							
Sim	24	80,0	113	86,3	137	85,1	0,385
Não	6	20,0	18	13,7	24	14,9	
Vacina							
Sim	16	53,3	101	77,7	117	73,1	0,007
Não	14	46,7	29	22,3	43	26,9	
Número de doses da vacina							
Nenhuma	14	46,7	29	22,3	43	26,9	0,011
Uma dose	7	23,3	26	20,0	33	20,6	
Duas doses	9	30,0	75	57,7	84	52,5	
Total	30	100,0	131	100,0	161	100,0	-----

Fonte: (AUTOR, 2015)

Algumas características ambientais, sociais e condições de moradia das famílias responsáveis pelas crianças que participaram do estudo foram analisadas. Das variáveis investigadas, 96,7% (29/30) moravam na zona urbana, 56,7% (17/30) residiam em terrenos firmes, 66,7% (20/30) tinham abastecimento de água da rede pública nas residências, conforme demonstrado na tabela 4. Porém, 66,7% (20/30), o destino dos dejetos da maioria das famílias era realizado por meio da rede geral de esgoto/fossa séptica,

Tabela 4- Características de moradia relacionadas com a infecção por rotavírus em crianças hospitalizadas. Macapá, Estado do Amapá, Brasil, 2014-2015.

Variáveis	Infecção por Rotavírus						p
	Sim		Não		Total		
	n	%	N	%	N	%	
Zona de residência							
Urbana	29	96,7	127	96,9	156	96,9	0,936
Rural	1	3,3	4	3,1	5	3,1	
Edificação							
Alvenaria	13	43,3	72	55,0	85	52,8	0,398
Madeira	15	50,0	55	42,0	70	43,5	
Mista	2	6,7	4	3,1	6	3,7	
Terreno							
Alagado	13	43,3	41	31,5	54	33,8	0,218
Firme	17	56,7	89	68,5	106	66,2	
Abastecimento de água							
Rede pública	20	66,7	85	64,9	105	65,2	0,737
Poço escavado/aberto	6	20,0	32	24,4	38	23,6	
Poço artesiano	1	3,3	7	5,3	8	5,0	
Rio/Igarapé	3	10,0	7	5,3	10	6,2	
Destino de dejetos							
Rede geral de esgoto	18	60,0	91	69,5	109	67,7	0,623
Fossa séptica	2	6,7	8	6,1	10	6,2	
Fossa rudimentar	3	10,0	6	4,6	9	5,6	
Rio/Igarapé	7	23,3	26	19,8	33	20,5	
Total	30	100,0	131	100,0	161	100,0	-----

Fonte: (AUTOR, 2015)

Na análise multivariada por regressão o fator que explica uma maior ocorrência de infecção por RVA é o uso da vacina VORH, onde a criança que não tomou a VORH apresentou 2,38 vezes maior prevalência de infecção em relação à criança que havia completado o esquema vacinal (IC_{95%} 1,27-4,46; *p* 0,007), conforme mostra a tabela 5.

Tabela 5 -Análise de regressão multivariada para a presença de infecção por rotavírus em crianças hospitalizadas. Macapá, Estado do Amapá, Brasil, 2014-2015.

Variável	RP (IC _{95%})	p
Vacina contra rotavírus		
Não	2,38 (1,27-4,46)	0,007
Sim	1	

RP: razão de prevalência. **IC_{95%}:** Intervalo de confiança de 95%. **p:** nível descritivo do teste de associação X^2 .

6.3 Elaboração do Procedimento Operacional Padrão modelo para as redes sentinelas do RV e Procedimentos Operacional Padrão para o diagnóstico molecular do RV no LACEN/AP.

Foi produzido o Procedimento Operacional Padrão modelo para as redes sentinelas do RV, como o objetivo de melhorar o fluxo de envio de amostras ao LACEN-AP. (APÊNDICE C) e Procedimentos Operacional Padrão para estabelecer o diagnóstico molecular do RV no LACEN/AP (APÊNDICE D).

7 DISCUSSÃO

7.1 PERFIL MOLECULAR DA INFECÇÃO POR RVA

Apesar da grande diversidade genômica e antigênica de RV, a nível mundial apenas um pequeno número de tipos de RV têm prevalecido em seres humanos durante os últimas 3 décadas: RVA de tipos G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], e, mais recentemente G9P[8] e G12P[8] co-circularam em alta frequência, contribuindo 80-90% de todas as infecções de RV na América do Norte, Europa e Austrália (DESSELBERGER, 2014)

Em Macapá, estado do Amapá, foram analisadas 161 amostras fecais 2015 provenientes de crianças diarreicas e não diarreicas de 0 a 5 anos de idade no período de janeiro de 2014 a julho de 2015, sendo que 22,2% (30/135) das crianças diarreicas apresentaram infecção por RVA. Essa frequência foi elevada se comparada com os dados de Neves et al., (2015) em estudo conduzido em Rio Branco no estado do Acre no período de 2011 a 2012 e de Gurgel et al., (2014) em Sergipe, no período de 2006 a 2012 os quais encontraram frequências inferiores de 9,6% (47/488) e 12,5% (231/1841) de positividade para RVA, respectivamente. Estes resultados provavelmente podem ser devido ao número amostral, a duração e ao período de condução do estudo.

No presente estudo observamos a circulação de RVA somente nas crianças diarreicas em frequência de 22,2% (30/135). Estes achados foram similares aos encontrados em Belém, Pará, região norte do Brasil que mostraram 24,1% de positividade para RVA em crianças hospitalizadas (JUSTINO et al., 2011) e na região centro oeste com frequência de 23,2% (ANDREASI et al., 2007). É possível que essas diferenças entre os resultados obtidos deva-se a fatores como período dos achados e a quantidade de crianças investigadas.

Vale ressaltar que a infecção por RVA em crianças assintomáticas não foi detectada no presente estudo o que difere de achados conduzidos na região norte que relataram a presença de RVA causando infecção nosocomial em neonatos internados em hospital público de Belém, Pará em 82,3% (42/51) dos neonatos (LINHARES et al., 2002) e em crianças com RVA assintomáticas para diarreia em que os RVA foram detectados em 1,2% (3/247) dos casos analisados em estudo conduzido em Rio Branco, Acre (NEVES et al., 2015).

Importantes estudos têm corroborado com a existência de infecção em indivíduos assintomáticos o que representa uma importante fonte de transmissão do vírus principalmente

associada ao norovírus e ao rotavírus (PHILLIPS et al., 2010; RAMANI., 2010). A ausência de positividade nos espécimes fecais de crianças assintomáticas analisadas na presente investigação pode representar uma limitação do estudo relacionada ao período das colheitas das amostras fecais, contudo, alerta-se para a necessidade do monitoramento contínuo nas redes sentinelas nos casos de infecção nosocomial por RVA.

A análise por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA) foi realizada em todas as amostras do presente estudo que foram positivas pelo teste imunoenzimático sendo detectado o padrão eletroforético de migração longa em 60% (18/30) dos casos. Vale ressaltar que todas as amostras negativas para RV na EGPA foram submetidas à RT-PCR. O contrário foi observado no estudo de Neves (2015) que observou tanto padrões com perfil eletroforético longo quanto curto, porém daqueles com padrão longo (27% das situações), estavam associados ao genótipo G12P[8].

O conhecimento da epidemiologia molecular dos RV é de grande relevância para a vigilância das DDAs bem como o monitoramento dos genótipos de RVA no período após a vacina. O estado do Amapá atualmente não possui dados sobre os genótipos circulantes de RVA na região e o presente estudo demonstrou a importância de se conhecer o grupo e os genótipos de RVA predominantes no estado. Durante o período analisado foi identificado um único tipo circulante, o genótipo emergente G12P[8]. Tal achado pode ser atribuído à introdução deste genótipo na região, à flutuação na circulação dos genótipos ao longo do tempo. Portanto, a monitorização das cepas circulantes na região é necessária durante o período pós vacina o que tem sido evidenciado em vários estudos conduzidos no Brasil e no mundo (DELOGU et al., 2015; NEVES et al., 2015b; SOARES et al., 2012).

No presente estudo, foi demonstrada uma prevalência de 100% das crianças com diarreia aguda infectadas pelo genótipo G12P[8]. Estudo conduzido por Delogu et al., (2015) em crianças hospitalizadas com e sem diarreia, relataram a disseminação do genótipo G12P[8] em 75% das crianças investigadas com RVA principalmente associado com os cinco genótipos G1, G3, G4, G9P[8] e G2P[4] que são os mais comuns em todo o mundo, além das amostras emergentes incluindo os genótipos G6, G8 e G12. Além disso, o G12P[8] foi observado se disseminando em uma área limitada da Itália durante um estudo de vigilância conduzido em 2012-2013. Ao norte da Espanha este genótipo foi detectado predominantemente em 65% dos casos de gastroenterite por RVA no período de 2010 a 2011 (CILLA et al., 2013). Esses dados confirmam o aumento crescente deste genótipo emergente em várias regiões do mundo, que possivelmente ocupará o sexto genótipo do globo (DELOGU et al., 2015)

Em estudo conduzido em Rio Branco, Acre, no período de 2011 a 2012 em amostras fecais de crianças diarreicas e não diarreicas o genótipo G12P[8] foi detectado em menor proporção e associado a 23% dos casos (NEVES et al., 2015a) além de algumas regiões da Argentina no período de 2008 a 2009 com uma incidência de 24,8% das infecções causadas pelo RVA G12P[8] (STUPKA; DEGIUSEPPE; PARRA, 2012).

Segundo Matthijnssens et al. (2012) a distribuição de genótipos de RVA flutua tanto no decorrer do tempo quanto nas diferentes regiões geográficas. Contudo, os mecanismos envolvidos neste fenômeno ainda não são bem estudados. Existem evidências de que tanto a imunidade homotípica quanto a heterotípica contra a infecção natural por RVA desempenha um papel importante tanto em nível individual quanto populacional. Vários fatores tais como o fluxo migratório crescente de pessoas no mundo; a emergência de variantes de RVA; a diversidade genética dos diferentes genótipos; a facilidade de transmissão e resistência do vírus; fatores relacionados ao hospedeiro (genéticos, anticorpos maternos, imunodeficiência, parasitas intestinais, desnutrição, deficiência de zinco, entre outros). Tais fatores poderiam também estar corroborando para a diversidade genética dos genótipos de RVA globalmente.

Mundialmente, antes da inclusão da VORH no Programa Nacional de Vacinação do Brasil, o genótipo mais predominante entre as amostras denominadas de usuais era o tipo G1P[8] (CARVALHO-COSTA et al., 2009), porém, no período pós vacina, foi registrada a circulação dos genótipos não usuais G12, circulando em várias regiões do país. Este fato, provavelmente foi devido a uma seleção ocorrida após a implantação da vacina (BUCARDO et al., 2015; GÓMEZ et al., 2014; LUCHS et al., 2015; SOARES et al., 2012).

Ainda com relação ao genótipo G12, este tem sido descrito desde 2003 na região sul do Brasil e de 2008–2010 na região norte em combinação com os genótipos P[9] e P[6], respectivamente. Contudo, até o momento, poucos trabalhos têm relatado o genoma completo do RVA G12. Silva et al. (2014) determinaram a constelação genômica do genótipo G12P[9] e G12P[8] detectados no Brasil entre 2006 e 2011 e sugeriram que os genótipos G12P[9] (AU-1-like) e G12P[8] (Wa-like) detectados em diferentes regiões do Brasil não compartilham uma origem comum. Já o G12P[8] compartilhou com a constelação RVA Wa-like humana. (GÓMEZ et al., 2014).

Soares et al. (2012), em estudo de vigilância dos genótipos de rotavírus identificaram o genótipo G12 na região norte do Brasil coletados a partir de crianças com diarreia aguda menores de cinco anos de idade acompanhadas no período de janeiro de 2008 a outubro de 2010. O genótipo mais prevalente foi o G2P[4] contribuindo com 45,6% (126/303) dos casos. O genótipo G12P[6] foi identificado associado a cinco casos, e este achado se constituiu na

primeira detecção do genótipo G12 na América Latina mostrando a emergência deste genótipo.

Já na presente análise, o genótipo G12 foi identificado em 100% dos casos. Esta alta prevalência foi descrita pela primeira vez na região norte por Neves et al. (2015a) em 23,4% dos casos analisados, porém circulando concomitantemente com outros genótipos usuais e não usuais de RVA.

7.2 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA INFECÇÃO POR RVA

Durante o período estudado foi demonstrado a tríade clássica associada à infecção por RVA, diarreia, vômito e febre em 43,3% (13/30) dos casos. Segundo Lanata et al., (2013), a gastroenterite pode ser causada por vários patógenos, entre os quais, os vírus são responsáveis por mais da metade dos casos. No presente estudo todas as crianças que apresentaram infecção por RVA estavam com quadro de diarreia aguda ($p < 0,008$). Das crianças que apresentaram febre e vômito associadas à infecção por RVA o índice foi de 43,3% (13/30). Staat et al. (2002) e Neves et al. (2015) obtiveram resultados superiores quando relacionaram febre e vômito a infecção por RVA, com frequências de 63% e 55% dos casos, respectivamente.

Durante as investigações do estudo atual, foi identificada somente positividade para RVA por cepas emergentes G12P[8]. Trabalhos recentes que relatam este genótipo emergente ainda não estão bem estabelecidos e não mostram relação da tríade clássica com relação a este genótipo não usual de RVA.

Em estudos de Vigilância das gastroenterites agudas, Linhares et al. (2006) sugerem que o estado imunológico após a introdução de novas cepas em uma determinada região e as variações na virulência entre as linhagem podem estar relacionadas com a gravidade da doença. Desse modo, é comum ocorrerem casos mais graves do que aqueles associados com os tipos comuns de RV devido a não exposição prévia aos tipos.

Dentre as crianças que apresentaram um percentual maior de ocorrência da infecção por RVA, estão as do sexo masculino com 63,3% dos casos confirmados. Esta frequência foi similar aos achados de Silva, Souza, Melo (2010) e Neves et al. (2015) que demonstraram prevalência de 72% e 61,7% dos casos masculinos, respectivamente.

Existem poucos relatos de estudos longitudinais que demonstrem a prevalência das cepas circulantes e a possível pressão exercida pela vacina e, portanto, tal possibilidade não pode ser excluída apesar de evidências que sugerem que tal predominância seja pela variação

secular, como nos estudos de Dóro et al. (2014). Além disso, Justino et al.(2011) e Yen et al.(2011), em pesquisa no período pós vacinal apontaram alta efetividade das vacinas Rotarix™ (RV1) e RotaTeq™ (RV5) contra as cepas não vacinais.No estudo atual o genótipo detectado circulando no estado do Amapá no período de 2014 a 2015 difere do genótipo usado na composição da vacina com 30% (9/30) das crianças tendo realizado as duas doses da VORH.

De acordo com dados da literatura, as vacinas contra o RV demonstraram eficácia nas duas doses para a prevenção de casos graves da infecção. No entanto, assim como nos estudos de Bucardo et al. (2015) registraram um elevado aumento nos índices de hospitalização associado com a emergência do genótipo G12 em população vacinada da Nicarágua que 30% (9/30) das cepas G12P[8] foram detectadas em crianças com esquema vacinal completo. Esse fato pode estar relacionado com a baixa imunidade vacinal em crianças com idade acima dos 12 meses (CORREIA et al., 2010).

Pesquisas apontam para o declínio dos níveis de anticorpos maternos transplacentários durante os primeiros meses de vida (CLARK et al., 2004). O potencial papel protetor do leite materno também foi relatado por (SANTOS et al., 2015), com a sugestão de que políticas públicas de saúde devam ser direcionadas para o contexto de cada localidade, a fim de reduzir os problemas que envolvem o desmame precoce. Uma possível explicação para o ocorrido neste estudo o qual demonstrou um índice de infecção para RVA de 20% (6/30), o que pode sugerir maior probabilidade de contrair infecções gastrintestinais.

Os dados obtidos neste estudo registraram a infecção por RV em mais de 80% das crianças na faixa etária de 6 a 24 meses, porém, não houve significância estatística ($p < 0,357$). Esta faixa etária mais prevalente foi semelhante a outros estudos conduzidos aqui no Brasil que apontam que é na faixa entre 6 a 24 meses que se observa a maior incidência de diarreia por RVA (LINHARES; ARAUJO; JUSTINO, 2013; LINHARES et al., 2011).

Observou-se que as características da população estudada são equivalentes com o evento sob estudo, ou seja, considerando as diarreias como agravo de transmissão fecal oral, são encontradas com frequência em família de baixa renda e que habitam em condições precárias de moradia. Por outro lado, é importante considerar que as diarreias causadas por RV podem acometer indivíduos de qualquer nível socioeconômico. Tais resultados também foram observados em estudos semelhantes, realizado em Recife, no Instituto Materno Infantil de Pernambuco (CAUÁS et al., 2006) e no Piauí, na cidade de Bom Jesus (ARAÚJO et al., 2010).

Vale ressaltar que neste estudo mais da metade (63,3%) dos responsáveis pelas crianças responderam que recebem uma renda mensal de até um salário mínimo. As condições socioeconômicas precárias em que vive a população investigada pode ser um fator de risco de doenças infecto-parasitárias. Todavia, independente de raça ou condições socioeconômicas, a infecção por RV atinge praticamente todas as crianças na faixa etária de 2 a 3 anos (LINHARES; ARAUJO; JUSTINO, 2013).

O presente estudo constatou que o esquema completo da VORH influenciou significativamente, na redução da infecção por RVA. Na análise de regressão multivariada o número de doses (esquema completo e incompleto) teve associação dependente com a infecção por RVA (Rp ajustada 2,38 IC 95% 1,27-4,46 p 0,007) mostrando uma possível proteção entre crianças que fizeram o esquema completo. Contudo, entre as crianças que foram idade elegível para a vacina, 30% (9/30), foram positivas para RVA e receberam a VORH, 100% delas foram infectadas pela cepa G12P[8].

Diversas investigações apontam que os riscos da saúde pública aumentam sob condições ambientais diversas. A vasta disseminação dos RV caracteriza efetiva transmissão inter-humana facilitada pela reconhecida estabilidade desses vírus no meio ambiente (GANIME et al., 2012; LINHARES; ARAUJO; JUSTINO, 2013).

Portanto, no presente estudo observou-se que 66,7% (20/30) das crianças infectadas por RVA possuíam abastecimento de água no domicílio oriundo da rede pública, mas, devido o abastecimento precário na região, estocavam a água para consumo em cisternas improvisadas e descobertas, favorecendo a contaminação. Outros 30%, referiram utilizar a água para consumo de poço escavado, rio e igarapé. Quanto ao destino de dejetos 67,7% dos entrevistados responderam que usavam a rede geral de esgoto e 20,5% eliminam os dejetos em rios e igarapés. Apesar de ser difícil se avaliar diretamente o impacto da contaminação ambiental na incidência e prevalência das doenças infecciosas em determinada região, diversos relatos sugerem que os riscos para a saúde pública aumentam em condições ambientais adversas, acrescentando a falta de acesso à água potável, esgotamento sanitário, coleta de resíduos sólidos e moradia adequada (PAZ; ALMEIDA; GÜNTHER, 2012; RASELLA, 2013). Segundo Miagostovich e Prado, (2014), o acesso ao saneamento básico, particularmente, esgotamento sanitário, ainda é bastante desigual no país e este está diretamente ligado à qualidade de vida da população. Dados sobre a distribuição e prevalência de grupos virais de importância médica no ambiente reforçam a importância do saneamento básico no controle das doenças virais de veiculação hídrica.

Concluindo, os resultados obtidos no presente estudo refletem a importância da gastroenterite aguda causada por RV no estado do Amapá, onde, o genótipo predominante no período estudado foi o G12P[8] que circulou na Europa, América e em algumas regiões do Brasil. Tal achado, confirma a necessidade da implementação da rede de vigilância no estado do Amapá visando à adoção de medidas educativas e de controle, além de estudos moleculares adicionais para a caracterização do genótipo G12P[8].

8 CONCLUSÃO

- O RVA foi detectado apenas nas crianças diarreicas do estado do Amapá no período de 2014 a 2015;
- Somente o padrão eletroforético longo de rotavírus A circulou entre as crianças estudadas;
- A prevalência do genótipo não usual confirmou a introdução de cepas emergentes de RVA no estado do Amapá;
- As crianças infectadas com o rotavírus apresentaram febre, vômito e diarreia confirmando a tríade clássica da doença;
- As condições de abastecimento de água da rede pública às comunidades e o destino adequado aos dejetos são fatores importantes para controlar a transmissão do RVA no Amapá;
- O uso do esquema completo da VORH representou uma importante estratégia para a diminuição da infecção por RVA.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante as análises epidemiológicas sobre a infecção por RVA no Amapá foi evidenciado a importância desses agentes no desenvolvimento das diarreias agudas, especialmente nas formas graves. Nesse contexto, se faz necessário a implementação de medidas de vigilância epidemiológica das diarreias. No presente estudo, observou-se a adoção de um modelo de Procedimento Operacional Padrão (POP) para envio de amostras ao LACEN pelas redes sentinelas do RV e POPs para estabelecer o diagnóstico molecular do RV no LACEN. Finalmente, ressalta-se a importância de se fazer o treinamento aos profissionais de saúde das unidades sentinelas para o enfrentamento dos casos de gastroenterite aguda na região, haja vista a relevância dos problemas causados pelos RV bem como o monitoramento dos genótipos circulantes na região, principalmente no cenário pós introdução da vacina contra rotavírus.

10 PERSPECTIVAS

A presente investigação demonstra que estudos moleculares adicionais são necessários para os genes VP7 e VP4, no que diz respeito ao sequenciamento de nucleotídeos além da elucidação dos genótipos circulantes para os outros genes estruturais e não estruturais de RVA genótipo do G12P[8] já que o crescimento deste tipo é global.

REFERÊNCIAS

- ALAM, N. H.; ASHRAF, H. Treatment of infectious diarrhea in children. **Pediatric Drugs**, v. 5, n. 3, p. 151-165, 2003.
- ANDREASI, M. S. A.; BATISTA, S. M. F.; TOZETTI, I. A.; OZAKI, C. O.; NOGUEIRA, M. M.; FIACCADORI, F. S.; BORGES, A. M. T.; SANTOS, R. A. T.; CARDOSO, D. D. D. P. Rotavirus A among hospitalized infants, up to three years of age, with acute gastroenteritis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 411-414, 2007.
- ARAÚJO, I.; FERREIRA, M.; FIALHO, A.; ASSIS, R.; CRUZ, C.; ROCHA, M.; LEITE, J. Rotavirus genotypes P [4] G9, P [6] G9, and P [8] G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1999-2001, 2001.
- ARAÚJO, T. M. E. D.; DANTAS, J. M.; CARVALHO, C. E. F.; COSTA, M. A. D. O. Outbreak of diarrhea by rotavirus in Bom Jesus city, Piauí State. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, p. 1039-1046, 2010.
- ATTOUI, H.; J BECNEL, S. B., M BERGOIN, CP BRUSSAARD, JD CHAPPELL.,. Reoviridae. In: Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. A King, M Adams, E Carstens, E Lefkowitz (eds.). pp. 497-650. Elsevier Academic Press, Waltham, Massachusetts, USA, 2012. In: KING, A.; ADAMS, M.; CARSTENS, E. e LEFKWITZ, E. (Ed.). **Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Waltham, Massachusetts, USA: Elsevier Academic Press, 2012. p.497-650.
- AZEVEDO, M. S.; YUAN, L.; JEONG, K. I.; GONZALEZ, A.; NGUYEN, T. V.; POULY, S.; GOCHNAUER, M.; ZHANG, W.; AZEVEDO, A.; SAIF, L. J. Viremia and nasal and rectal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus. **Journal of Virology**, v. 79, n. 9, p. 5428-36, May 2005.
- BALDACCI, E. R.; CANDEIAS, J.; BREVIGLIERI, J. C.; GRISI, S. J. E. Etiologia viral e bacteriana de casos de gastroenterite infantil: uma caracterização clínica. **Revista de Saúde pública**, p. 47-53, 1979.
- BÁNYAI, K.; LÁSZLÓ, B.; DUQUE, J.; STEELE, A. D.; NELSON, E. A. S.; GENTSCH, J. R.; PARASHAR, U. D. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. **Vaccine**, v. 30, p. A122-A130, 2012.
- BERNSTEIN, D. I. Rotavirus overview. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, n. 3, p. S50-S53, 2009.
- BISHOP, R.; DAVIDSON, G.; HOLMES, I.; RUCK, B. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **The Lancet**, v. 302, n. 7841, p. 1281-1283, 1973.
- _____. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. **The Lancet**, v. 303, n. 7849, p. 149-151, 1974.
- BLUTT, S. E.; MATSON, D. O.; CRAWFORD, S. E.; STAAT, M. A.; AZIMI, P.; BENNETT, B. L.; PIEDRA, P. A.; CONNER, M. E. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 4, p. 660, 2007.
- BOOM, R.; SOL, C.; SALIMANS, M.; JANSEN, C.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- BRASIL. **Doença Diarréica por Rotavírus: Vigilância Epidemiológica e Prevenção pela Vacina Oral de Rotavírus Humano - VORH**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.
- _____. **Óbito por residência, por capítulo CID10, segundo região**. Ministério da Saúde. SUS, D. D. I. D. Brasília: Ministerio da Saúde, 2013.

BRICKS, L. F. Rotavírus: atualização sobre doenças e vacinas. **Pediatria (São Paulo)**, v. 27, n. 4, p. 252-266, 2005.

BRUIJNING-VERHAGEN, P.; QUACH, C.; BONTEN, M. Nosocomial rotavirus infections: a meta-analysis. **Pediatrics**, v. 129, n. 4, p. e1011-e1019, 2012.

BUCARDO, F.; MERCADO, J.; REYES, Y.; GONZALEZ, F.; BALMASEDA, A.; NORDGREN, J. Large increase of rotavirus diarrhoea in the hospital setting associated with emergence of G12 genotype in a highly vaccinated population in Nicaragua. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 603 e1-7, Jun 2015.

CARVALHO-COSTA, F. A.; ARAÚJO, I. T.; DE ASSIS, R. M. S.; FIALHO, A. M.; DE ASSIS MARTINS, C. M. M.; BÓIA, M. N.; LEITE, J. P. G. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 95, 2009.

CAUÁS, R. C.; FALBO, A. R.; CORREIA, J. D. B.; OLIVEIRA, K. M. M. D.; MONTENEGRO, F. M. U. Diarréia por rotavírus em crianças desnutridas hospitalizadas no Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, IMP. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 6, p. s77-s83, 2006.

CHANDLER-BOSTOCK, R.; HANCOX, L. R.; PAYNE, H.; ITURRIZA-GOMARA, M.; DALY, J. M.; MELLITS, K. H. Diversity of group A rotavirus on a UK pig farm. **Veterinary Microbiology**, v. 180, n. 3-4, p. 205-11, Nov 18 2015.

CILLA, G.; MONTES, M.; GOMARIZ, M.; ALKORTA, M.; ITURZAETA, A.; PEREZ-YARZA, E.; PEREZ-TRALLERO, E. Rotavirus genotypes in children in the Basque Country (North of Spain): rapid and intense emergence of the G12 [P8] genotype. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 04, p. 868-874, 2013.

CLARK, H. F.; BERNSTEIN, D. I.; DENNEHY, P. H.; OFFIT, P.; PICHICHERO, M.; TREANOR, J.; WARD, R. L.; KRAH, D. L.; SHAW, A.; DALLAS, M. J. Safety, efficacy, and immunogenicity of a live, quadrivalent human-bovine reassortant rotavirus vaccine in healthy infants. **The Journal of Pediatrics**, v. 144, n. 2, p. 184-190, 2004.

CORREIA, J. B.; PATEL, M. M.; NAKAGOMI, O.; MONTENEGRO, F. M.; GERMANO, E. M.; CORREIA, N. B.; CUEVAS, L. E.; PARASHAR, U. D.; CUNLIFFE, N. A.; NAKAGOMI, T. Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P[4] strains in Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 3, p. 363-9, Feb 1 2010.

COSTA, M. S. M.; NOGUEIRA, P. A.; MAGALHÃES, G. F.; TAQUITA, P.; MARIÚBA, L. A.; PENATTI, M.; ORLANDI, P. P. Rotavirus genotyping in gastroenteritis cases of an infantile population from Western Brazilian Amazonia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 520-522, 2012.

DA SILVA SOARES, L.; DOS SANTOS LOBO, P.; MASCARENHAS, J. D. A. P.; NERI, D. L.; DOS SANTOS GUERRA, S. D. F.; DE OLIVEIRA, A. D. S. L.; MAESTRI, R. P.; DE SOUZA OLIVEIRA, D.; DA COSTA LINHARES, A. Identification of lineage III of G12 rotavirus strains in diarrheic children in the Northern Region of Brazil between 2008 and 2010. **Archives of Virology**, v. 157, n. 1, p. 135-139, 2012.

DAVIDSON, G.; BISHOP, R.; TOWNLEY, R.; HOLMES, I.; RUCK, B. Importance of a new virus in acute sporadic enteritis in children. **The Lancet**, v. 305, n. 7901, p. 242-246, 1975.

DELOGU, R.; IANIRO, G.; CAMILLONI, B.; FIORE, L.; RUGGERI, F. M. Unexpected spreading of G12P[8] rotavirus strains among young children in a small area of central Italy. **Journal of Medical Virology**, v. 87, n. 8, p. 1292-302, Aug 2015.

DESAI, R.; OLIVEIRA, L. H. D.; PARASHAR, U. D.; LOPMAN, B.; TATE, J. E.; PATEL, M. M. Reduction in morbidity and mortality from childhood diarrhoeal disease after species A rotavirus vaccine introduction in Latin America: a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 907-911, 2011.

DESSELBERGER, U. Rotaviruses. **Virus Research**, v. 190, p. 75-96, 2014.

DO CARMO, G. M. I.; YEN, C.; CORTES, J.; ARAÚJO SIQUEIRA, A.; DE OLIVEIRA, W. K.; JOSÉ CORTEZ-ESCALANTE, J.; LOPMAN, B.; FLANNERY, B.; DE OLIVEIRA, L. H.; HAGE CARMO, E. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. **PLoS Medicine**, v. 8, n. 4, p. 532, 2011.

DÓRÓ, R.; LÁSZLÓ, B.; MARTELLA, V.; LESHEM, E.; GENTSCH, J.; PARASHAR, U.; BÁNYAI, K. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: Is there evidence of strain selection from vaccine pressure? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 446-461, 2014.

ENSERINK, R.; VAN DEN WIJNGAARD, C.; BRUIJNING-VERHAGEN, P.; VAN ASTEN, L.; MUGHINI-GRAS, L.; DUIZER, E.; KORTBEEK, T.; SCHOLTS, R.; NAGELKERKE, N.; SMIT, H. A. Gastroenteritis Attributable to 16 Enteropathogens in Children Attending Day Care: Significant Effects of Rotavirus, Norovirus, Astrovirus, Cryptosporidium and Giardia. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 34, n. 1, p. 5-10, 2015.

ESTES, M. K.; GREENBERG, H. B. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields in Virology**. 6: LWW, v.1, 2013. cap. 45, p.1347-1401.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. e GRIFFIN, D. E. (Ed.). **Fields in Virology**. Philadelphia: Lippincott. Williams and Wilkins, v.2, 2007. p.1917-1957.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. e GRIFFIN, D. E. (Ed.). **Fields in Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.2, 2001. p.1455-1478.

FENG, N.; KIM, B.; FENAUX, M.; NGUYEN, H.; VO, P.; OMARY, M.; GREENBERG, H. Role of interferon in homologous and heterologous rotavirus infection in the intestines and extraintestinal organs of suckling mice. **Journal of Virology**, v. 82, n. 15, p. 7578-7590, 2008.

FLEWETT, T.; BRYDEN, A.; DAVIES, H.; WOODE, G.; BRIDGER, J.; DERRICK, J. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. **The Lancet**, v. 304, n. 7872, p. 61-63, 1974.

GANIME, A. C.; CARVALHO-COSTA, F. A.; MENDONÇA, M. C. L.; VIEIRA, C. B.; SANTOS, M.; COSTA FILHO, R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LEITE, J. P. G. Group A rotavirus detection on environmental surfaces in a hospital intensive care unit. **American Journal of Infection Control**, v. 40, n. 6, p. 544-547, 2012.

GENTSCH, J.; GLASS, R.; WOODS, P.; GOUVEA, V.; GORZIGLIA, M.; FLORES, J.; DAS, B.; BHAN, M. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 1365-1373, 1992.

GHOSH, S.; GATHERU, Z.; NYANGAO, J.; ADACHI, N.; URUSHIBARA, N.; KOBAYASHI, N. Full genomic analysis of a G8P [1] rotavirus strain isolated from an asymptomatic infant in Kenya provides evidence for an antrodactyl- to- human interspecies transmission event. **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 2, p. 367-376, 2011.

GLEIZES, O.; DESSELBERGER, U.; TATOCHENKO, V.; RODRIGO, C.; SALMAN, N.; MEZNER, Z.; GIAQUINTO, C.; GRIMPREL, E. Nosocomial rotavirus infection in European countries: a review of the epidemiology, severity and economic burden of hospital-acquired rotavirus disease. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 25, n. 1, p. S12-S21, 2006.

GÓMEZ, M. M.; RESQUE, H. R.; DE MELLO VOLOTÃO, E.; ROSE, T. L.; DA SILVA, M. F. M.; HEYLEN, E.; ZELLER, M.; MATTHIJNSSENS, J.; LEITE, J. P. G. Distinct evolutionary origins of G12P [8] and G12P [9] group A rotavirus strains circulating in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 385-388, 2014.

GOUVEA, V.; GLASS, R. I.; WOODS, P.; TANIGUCHI, K.; CLARK, H. F.; FORRESTER, B.; FANG, Z. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 276-282, 1990.

GUIMARÃES, T. M. R.; ALVES, J. G. B.; TAVARES, M. M. F. Impacto das ações de imunização pelo Programa Saúde da Família na mortalidade infantil por doenças evitáveis em Olinda, Pernambuco, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 4, p. 868-76, 2009.

GUNN, L.; FEENEY, S.; CASHMAN, O.; COLLINS, P.; COYLE, P.; O'SHEA, H. Molecular characterization of group A rotavirus found in elderly patients in Ireland; predominance of G1P [8], continued presence of G9P [8], and emergence of G2P [4]. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 12, p. 2008-2017, 2012.

GURGEL, R. Q.; ALVAREZ, A. D. J.; RODRIGUES, A.; RIBEIRO, R. R.; DOLABELLA, S. S.; DA MOTA, N. L.; SANTOS, V. S.; ITURRIZA-GOMARA, M.; CUNLIFFE, N. A.; CUEVAS, L. E. Incidence of Rotavirus and Circulating Genotypes in Northeast Brazil during 7 Years of National Rotavirus Vaccination. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e110217, 2014.

GURGEL, R. Q.; CUNLIFFE, N. A.; NAKAGOMI, O.; CUEVAS, L. E. Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: a review. **Journal of Clinical Virology**, v. 43, n. 1, p. 1-8, 2008.

HARRISON, S. C. Principles of Virus Structure. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Field's in Virology**. 5. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p.59-98.

HERRING, A.; INGLIS, N.; OJEH, C.; SNODGRASS, D. A.; MENZIES, J. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 473-477, 1982.

ITURRIZA-GOMARA, M.; AUCHTERLONIE, I.; ZAW, W.; MOLYNEAUX, P.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. Rotavirus gastroenteritis and central nervous system (CNS) infection: characterization of the VP7 and VP4 genes of rotavirus strains isolated from paired fecal and cerebrospinal fluid samples from a child with CNS disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 12, p. 4797-4799, 2002.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; DALLMAN, T.; BÁNYAI, K.; BÖTTIGER, B.; BUESA, J.; DIEDRICH, S.; FIORE, L.; JOHANSEN, K.; KOOPMANS, M.; KORSUN, N. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 06, p. 895-909, 2011.

JUSTINO, M. C. A.; LINHARES, A. C.; LANZIERI, T. M.; MIRANDA, Y.; MASCARENHAS, J. D. A. P.; ABREU, E.; GUERRA, S. F.; OLIVEIRA, A. S.; DA SILVA, V. B.; SANCHEZ, N. Effectiveness of the monovalent G1P [8] human rotavirus vaccine against hospitalization for severe G2P [4] rotavirus gastroenteritis in Belém, Brazil. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 30, n. 5, p. 396-401, 2011.

KANG, G.; DESAI, R.; ARORA, R.; CHITAMABAR, S.; NAIK, T. N.; KRISHNAN, T.; DESHPANDE, J.; GUPTA, M. D.; VENKATASUBRAMANIAM, S.; GENTSCH, J. R. Diversity of circulating rotavirus strains in children hospitalized with diarrhea in India, 2005–2009. **Vaccine**, v. 31, n. 27, p. 2879-2883, 2013.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: D.M, K. e HOWLEY (Ed.). **Fields in Virology**. 4. Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.1787-1833.

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Tandem copies of a human rotavirus VP8 epitope can induce specific neutralizing antibodies in BALB/c mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1760, n. 12, p. 1884-1893, 2006.

LA FRAZIA, S.; CIUCCI, A.; ARNOLDI, F.; COIRA, M.; GIANFERRETTI, P.; ANGELINI, M.; BELARDO, G.; BURRONE, O. R.; ROSSIGNOL, J.-F.; SANTORO, M. G. Thiazolidines, a new class of antiviral agents effective against rotavirus infection, target viral morphogenesis, inhibiting viroplasm formation. **Journal of Virology**, v. 87, n. 20, p. 11096-11106, 2013.

LANATA, C. F.; FISCHER-WALKER, C. L.; OLASCOAGA, A. C.; TORRES, C. X.; ARYEE, M. J.; BLACK, R. E. Global causes of diarrheal disease mortality in children < 5 years of age: a systematic review. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e72788, 2013.

- LANZIERI, T. M.; LINHARES, A. C.; COSTA, I.; KOLHE, D. A.; CUNHA, M. H.; ORTEGA-BARRIA, E.; COLINDRES, R. E. Impact of rotavirus vaccination on childhood deaths from diarrhea in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. e206-e210, 2011.
- LEITE, J. P. G.; CARVALHO-COSTA, F. A.; LINHARES, A. C. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 745-753, 2008.
- LINHARES, A.; ARAUJO, E.; JUSTINO, M. Rotavíruses. In: COURA, J. (Ed.). **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p.1898-1920.
- LINHARES, A.; GABBAY, Y.; FREITAS, R. D.; TRAVASSOS DA ROSA, E.; MASCARENHAS, J.; LOUREIRO, E. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 102, n. 01, p. 129-145, 1989.
- LINHARES, A. C.; BRESEE, J. S. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 8, n. 5, p. 305-331, 2000.
- LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; SCHMETZ, C.; MÜLLER, G.; PETERS, D.; . **Rotavírus em Belém do Pará, Brasil**. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. São Paulo: 19:278 p. 1977.
- LINHARES, A. C.; STUPKA, J. A.; CIAPPONI, A.; BARDACH, A. E.; GLUJOVSKY, D.; ARUJ, P. K.; MAZZONI, A.; RODRIGUEZ, J. A. B.; REARTE, A.; LANZIERI, T. M. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta- analysis. **Reviews in Medical Virology**, v. 21, n. 2, p. 89-109, 2011.
- LINHARES, A. C.; VELÁZQUEZ, F. R. Rotavirus P [4] G2 in a vaccinated population, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 864, 2008.
- LINHARES, A. C.; VILLA, L. L. Vaccines against rotavirus and human papillomavirus (HPV). **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 3, p. s25-s34, 2006.
- LUCHELLI, A.; LANCE, S.; BARTLETT, P.; MILLER, G.; SAIF, L. Prevalence of bovine group A rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 2, p. 169-174, 1992.
- LUCHS, A.; CILLI, A.; MORILLO, S. G.; CARMONA, R. D. C. C.; TIMENETSKY, M. D. C. S. T. ROTAVIRUS GENOTYPES CIRCULATING IN BRAZIL, 2007-2012: IMPLICATIONS FOR THE VACCINE PROGRAM. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 305-313, 2015.
- LUCHS, A.; TIMENETSKY, M. D. C. S. T. G8P [6] rotaviruses isolated from Amerindian children in Mato Grosso do Sul, Brazil, during 2009: close relationship of the G and P genes with those of bovine and bat strains. **Journal of General Virology**, v. 95, n. Pt 3, p. 627-641, 2014.
- LUZ, C. R. N.; MASCARENHAS, J. D.; GABBAY, Y. B.; MOTTA, A. R. B.; RIBEIRO LIMA, T. V.; SOARES, L. D. S.; LINHARES, A. C. Rotavirus serotypes and electrophoretotypes identified among hospitalised children in Sao Luis, Maranhao, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 5, p. 287-293, 2005.
- MARQUES, M. F. D. S.; TORT, L. F. L.; GOMÉZ, M. M.; ASSIS, R. M. S.; VOLOTÃO, E. D. M.; DE MENDONÇA, M. C. L.; BELLO, G.; LEITE, J. P. G. VP7 Gene of human rotavirus A genotype G5: Phylogenetic analysis reveals the existence of three different lineages worldwide. **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 2, p. 357-366, 2011.
- MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; MATTHIJNSSENS, J.; BUONAVOGLIA, C.; CIARLET, M. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3, p. 246-255, 2010.
- MASCARENHAS, J.; ARIAS, C. F.; PADILLA-NORIEGA, L.; LÓPEZ, S.; GUSMÃO, R. H. P.; GABBAY, Y. B.; LINHARES, A. C. Characterization of rotavirus strains with unusual electrophoretic profiles. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 6, p. 771-774, 1997.

- MASCARENHAS, J. D. A. P.; LEITE, J. P. G.; LIMA, J. C.; HEINEMANN, M. B.; OLIVEIRA, D. S.; ARAÚJO, I. T.; SOARES, L. S.; GUSMÃO, R. H. P.; GABBAY, Y. B.; LINHARES, A. C. Detection of a neonatal human rotavirus strain with VP4 and NSP4 genes of porcine origin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 524-532, 2007.
- MATTHEWS, R. Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Classification and nomenclature of viruses. **Intervirology**, v. 12, n. 3-5, p. 129, 1979.
- MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; MCDONALD, S. M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; BRISTER, J. R.; BUESA, J.; ESONA, M. D.; ESTES, M. K.; GENTSCH, J. R. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Archives of Virology**, v. 156, n. 8, p. 1397-1413, 2011.
- MATTHIJNSSENS, J.; HEYLEN, E.; ZELLER, M.; RAHMAN, M.; LEMEY, P.; VAN RANST, M. Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 10, p. 2431-2436, 2010.
- MATTHIJNSSENS, J.; OTTO, P. H.; CIARLET, M.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M.; JOHNE, R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Archives of Virology**, v. 157, n. 6, p. 1177-1182, 2012.
- MBUH, F. A.; ARMAH, G. E.; OMILABU, S. A.; AHMAD, A. A.; UMOH, J. U. Molecular epidemiology of group A human rotaviruses in North West region, Cameroon. **Pan African Medical Journal**, v. 12, n. 1, 2013.
- MIHALOV-KOVÁCS, E.; GELLÉRT, Á.; MARTON, S.; FARKAS, S. L.; FEHÉR, E.; OLDAL, M.; JAKAB, F.; MARTELLA, V.; BÁNYAI, K. Candidate New Rotavirus Species in Sheltered Dogs, Hungary. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 4, p. 660, 2015.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Indicadores e dados básicos. Indicadores de Mortalidade. 2012. Disponível em: <<http://tabnet.datassus.gov.br/cgi/idb2012/matriz.htm - mort>>. Acesso em: 19 de abril.
- MORILLO, S. G.; LUCHS, A.; CILLI, A.; COSTA, F. F.; CARMONA, R. D. C. C.; TIMENETSKY, M. D. C. S. Caracterização de genótipos de rotavírus em creches: era pré e pós-vacinação contra o rotavírus. **Jornal de Pediatria. (Rio Janeiro)**, v. 86, n. 2, p. 155-158, 2010.
- MUNFORD, V.; CARUSO, T. A.; RACZ, M. L. Gastreenterite Virais. In: TRABULSI, L. R. e ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5. São Paulo: Atheneu, 2008. p.619- 623.
- NEVES, M. A.; PINHEIRO, H. H.; SILVA, R. S.; LINHARES, A. C.; SILVA, L. D.; GABBAY, Y. B.; SILVA, M.; LOUREIRO, E. C.; SOARES, L. S.; MASCARENHAS, J. D. High prevalence of G12P [8] rotavirus strains in Rio Branco, Acre, Western Amazon, in the post- rotavirus vaccine introduction period. **Journal of Medical Virology**, 2015a.
- NEVES, M. A.; PINHEIRO, H. H.; SILVA, R. S.; LINHARES, A. C.; SILVA, L. D.; GABBAY, Y. B.; SILVA, M. C.; LOUREIRO, E. C.; SOARES, L. S.; MASCARENHAS, J. D. High prevalence of G12P[8] rotavirus strains in Rio Branco, Acre, Western Amazon, in the post-rotavirus vaccine introduction period. **J Med Virol**, Oct 15 2015b.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologolonia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, 2004.
- O'RYAN, M.; LINHARES, A. C. Update on Rotarix™: an oral human rotavirus vaccine. **Expert review of Vaccines**, v. 8, n. 12, p. 1627-1641, 2009.
- O'RYAN, M.; PEREZ-SCHAEL, I.; MAMANI, N.; PENA, A.; SALINAS, B.; GONZALEZ, G.; GONZALEZ, F.; MATSON, D. O.; GOMEZ, J. Rotavirus-associated medical visits and hospitalizations in South America: a prospective study at three large sentinel hospitals. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 20, n. 7, p. 685-693, 2001.

OLIVEIRA, C. S.; GABBAY, Y. B.; MASCARENHAS, J. D. P.; LINHARES, A. C. Infecções por Rotavírus. In: FARHAT; CARVALHO e SUCCI (Ed.). **Infectologia Pediátrica**. 3: Atheneu, 2007.

OLIVEIRA, R. B. D. **Avaliação da vigilância epidemiológica ampliada do rotavírus no Brasil**. 2011. 113 Dissertação (Mestrado em Epidemiologia de Saúde Pública). Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2011.

PARASHAR, U. D.; BURTON, A.; LANATA, C.; BOSCHI-PINTO, C.; SHIBUYA, K.; STEELE, D.; BIRMINGHAM, M.; GLASS, R. I. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. **Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. Supplement 1, p. S9-S15, 2009.

PARASHAR, U. D.; GIBSON, C. J.; BRESSE, J.; GLASS, R. I. Rotavirus and severe childhood diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 304, 2006.

PARASHAR, U. D.; HUMMELMAN, E. G.; BRESEE, J. S.; MILLER, M. A.; GLASS, R. I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 565, 2003.

PATEL, M.; RENCH, M. A.; BOOM, J. A.; TATE, J. E.; SAHNI, L. C.; HULL, J. A.; GENTSCH, J. R.; PARASHAR, U. D.; BAKER, C. J. Detection of rotavirus antigenemia in routinely obtained serum specimens to augment surveillance and vaccine effectiveness evaluations. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 29, n. 9, p. 836-839, 2010.

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

PAYNE, D. C.; SZILAGYI, P. G.; STAAT, M. A.; EDWARDS, K. M.; GENTSCH, J. R.; WEINBERG, G. A.; HALL, C. B.; CURNS, A. T.; CLAYTON, H.; GRIFFIN, M. R. Secular variation in United States rotavirus disease rates and serotypes: implications for assessing the rotavirus vaccination program. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, n. 11, p. 948-953, 2009.

PAZ, M. G. A. D.; ALMEIDA, M. F. D.; GÜNTHER, W. M. R. Prevalência de diarreia em crianças e condições de saneamento e moradia em áreas periurbanas de Guarulhos, SP. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 15, n. 1, p. 188-197, 2012.

PEREIRA, H. G.; AZEREDTO, R.; SUTMOLLER, F.; LEITE, J.; FARIAS, V. D.; BARTH, O.; VIDAL, M. Comparation of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 78, n. 4, p. 483-490, 1983.

PIETRUCHINSKI, E.; BENATI, F.; LAURETTI, F.; KISIELIUS, J.; UEDA, M.; VOLOTÃO, E. M.; SOARES, C. C.; HOSHINO, Y.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. Rotavirus diarrhea in children and adults in a southern city of Brazil in 2003: distribution of G/P types and finding of a rare G12 strain. **Journal of Medical Virology**, v. 78, n. 9, p. 1241-1249, 2006.

PODEWILS, L. J.; MINTZ, E. D.; NATARO, J. P.; PARASHAR, U. D. Acute, infectious diarrhea among children in developing countries. *Seminars in pediatric infectious diseases*, 2004. WB Saunders. p.155-168.

RAHMAN, M.; MATTHIJNSSENS, J.; YANG, X.; DELBEKE, T.; ARIJS, I.; TANIGUCHI, K.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; IFTEKHARUDDIN, N.; AZIM, T.; VAN RANST, M. Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. **Journal of Virology**, v. 81, n. 5, p. 2382-2390, 2007.

RASELLA, D. Impacto do Programa Água para Todos (PAT) sobre a morbi-mortalidade por diarreia em crianças do Estado da Bahia, Brasil Impact of the Water for All Program (PAT) on childhood morbidity and mortality from. **Caderno de Saúde Pública**, v. 29, n. 1, p. 40-50, 2013.

RICHARDSON, V.; HERNANDEZ-PICHARDO, J.; QUINTANAR-SOLARES, M.; ESPARZA-AGUILAR, M.; JOHNSON, B.; GOMEZ-ALTAMIRANO, C. M.; PARASHAR, U.; PATEL, M. Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 4, p. 299-305, 2010.

RIPSA. Indicadores Básicos para a Saúde no Brasil: conceitos e aplicações. In: (Ed.). 2: Organização Pan-Americana da Saúde, 2008.

RUIZ, M. C.; LEON, T.; DIAZ, Y.; MICHELANGELI, F. Molecular biology of rotavirus entry and replication. **The Scientific World Journal**, v. 9, p. 1476-1497, 2009.

SANTOS, F. S.; SANTOS, F. C. S.; DOS SANTOS, L. H.; LEITE, A. M.; DE MELLO, D. F. Aleitamento materno e proteção contra diarreia: revisão integrativa da literatura. **Einstein (16794508)**, v. 13, n. 3, 2015.

SANTOS, N.; SOARES, C. C.; VOLOTÃO, E. M.; ALBUQUERQUE, M. C. M.; HOSHINO, Y. Surveillance of rotavirus strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3399-3402, 2003.

SANTOS, N. S. O.; SOARES, C. C. Vírus Entéricas. In: SANTOS, N. S. O. (Ed.). **Introdução à Virologia Humana**. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.145-160.

SARTORI, A. M. C.; VALENTIM, J.; SOÁREZ, P. C. D.; NOVAES, H. M. D. Rotavirus morbidity and mortality in children in Brazil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 23, n. 2, p. 92-100, 2008.

SHOJA, Z.; JALILVAND, S.; MOLLAEI-KANDELOUS, Y.; VALIDI, M. Epidemiology of viral gastroenteritis in Iran. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 33, n. 2, p. 218-220, 2014.

SIQUEIRA, A. A.; SANTELLI, A.; ALENCAR, L.; DANTAS, M.; DIMECH, C.; CARMO, G.; SANTOS, D.; ALVES, R.; LUCENA, M.; MORAIS, M. Outbreak of acute gastroenteritis in young children with death due to rotavirus genotype G9 in Rio Branco, Brazilian Amazon region, 2005. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 10, p. e898-e903, 2010.

SOARES, L. D. S.; DOS SANTOS LOBO, P.; MASCARENHAS, J. D. A. P.; NERI, D. L.; DOS SANTOS GUERRA, S. D. F.; DE OLIVEIRA, A. D. S. L.; MAESTRI, R. P.; DE SOUZA OLIVEIRA, D.; DA COSTA LINHARES, A. Identification of lineage III of G12 rotavirus strains in diarrheic children in the Northern Region of Brazil between 2008 and 2010. **Archives of Virology**, v. 157, n. 1, p. 135-139, 2012.

STEWIEN, K. E.; DURIGON, E. L.; TANAKA, H.; GILIO, A. E.; BALDACCI, E. R. Ocorrência de astrovírus humanos na cidade de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 25, p. 157-158, 1991.

STUPKA, J. A.; DEGIUSEPPE, J. I.; PARRA, G. I. Increased frequency of rotavirus G3P [8] and G12P [8] in Argentina during 2008–2009: whole-genome characterization of emerging G12P [8] strains. **Journal of Clinical Virology**, v. 54, n. 2, p. 162-167, 2012.

TAFAZOLI, F.; ZENG, C. Q.; ESTES, M. K.; MAGNUSSON, K.-E.; SVENSSON, L. NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells. **Journal of Virology**, v. 75, n. 3, p. 1540-1546, 2001.

TANIGUCHI, K.; URASAWA, T.; KOBAYASHI, N.; GORZIGLIA, M.; URASAWA, S. Nucleotide sequence of VP4 and VP7 genes of human rotaviruses with subgroup I specificity and long RNA pattern: implication for new G serotype specificity. **Journal of Virology**, v. 64, n. 11, p. 5640-5644, 1990.

TATE, J. E.; BURTON, A. H.; BOSCHI-PINTO, C.; STEELE, A. D.; DUQUE, J.; PARASHAR, U. D. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 136-141, 2012.

TATE, J. E.; PARASHAR, U. D. Rotavirus vaccine in routine use. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, p. 1291-1301, 2014.

TROJNAR, E.; OTTO, P.; ROTH, B.; REETZ, J.; JOHNE, R. The genome segments of a group D rotavirus possess group A-like conserved termini but encode group-specific proteins. **Journal of Virology**, v. 84, n. 19, p. 10254-10265, 2010.

- TROJNAR, E.; SACHSENROEDER, J.; TWARDZIOK, S.; REETZ, J.; OTTO, P. H.; JOHNE, R. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. **Journal of General Virology**, v. 94, n. 1, p. 136-142, 2013.
- VRANJAC, A. Diarrhea and rotavirus. **Revista de saúde pública**, v. 38, n. 6, p. 844-845, 2004.
- WALKER, C. L. F.; RUDAN, I.; LIU, L.; NAIR, H.; THEODORATOU, E.; BHUTTA, Z. A.; O'BRIEN, K. L.; CAMPBELL, H.; BLACK, R. E. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. **The Lancet**, v. 381, n. 9875, p. 1405-1416, 2013.
- WHO. Rotavirus surveillance data reporting period: January through December 2010. **Global rotavirus information and surveillance bulletin**, v. 4, 2011.
- _____. Rotavirus surveillance data reporting period: January - June 2012. **Global Rotavirus Information and Surveillance Bulletin**, v. 7, 2013.
- _____. Vaccine in National Immunization Programme Update. 2015. Disponível em: < http://www.who.int/entity/immunization/monitoring_surveillance/VaccineIntroStatus.pptx >. Acesso em: 07/10/2015.
- WYATT, R. G.; KAPIKIAN, A. Z.; THORNHILL, T. S.; SERENO, M. M.; KIM, H. W.; CHANOCK, R. M. In vitro cultivation in human fetal intestinal organ culture of a reovirus-like agent associated with nonbacterial gastroenteritis in infants and children. **Journal of Infectious Diseases**, v. 130, n. 5, p. 523-528, 1974.
- YEN, C.; TATE, J. E.; PATEL, M. M.; CORTESE, M. M.; LOPMAN, B.; FLEMING, J.; LEWIS, K.; JIANG, B.; GENTSCH, J. R.; STEELE, A. D. Rotavirus vaccines: update on global impact and future priorities. **Human Vaccines**, v. 7, n. 12, p. 1282-1290, 2011.
- YU, J.; JING, H.; LAI, S.; XU, W.; LI, M.; WU, J.; LIU, W.; YUAN, Z.; CHEN, Y.; ZHAO, S. Etiology of diarrhea among children under the age five in China: Results from a five-year surveillance. **Journal of Infection**, v. 71, n. 1, p. 19-27, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Implantação da Técnica de RT-PCR para a Determinação dos Genótipos de Rotavírus A Circulantes em Crianças no Amapá em apoio a Vigilância Epidemiológica.

O seu filho, ou menor sob sua responsabilidade, está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Por favor, leia as informações cuidadosamente e discuta com quem desejar. Pergunte-nos se houver algo que não esteja claro ou caso queira mais informações.

1. Qual é o objetivo do estudo?

Identificar a presença de Rotavírus presentes nas fezes de crianças com e sem o quadro diarreico contribuindo assim com a Vigilância Epidemiológica junto à Secretaria de Saúde do Amapá com o intuito de melhorar o diagnóstico, o tratamento e o esclarecimento a população sobre este vírus.

2. O que esses vírus podem fazer?

Os Rotavírus podem causar diarreia, dor de barriga, febre, enjôo, vômito e dor no corpo. Se não tratada pode levar a desnutrição.

3. Meu filho (ou menor sob minha responsabilidade) não está doente. Por que ele foi escolhido?

Porque crianças que não estão doentes também podem ter na barriga alguns vírus e não sentir nada.

4. Meu filho (ou menor sob minha responsabilidade) tem que participar da pesquisa?

Não. Você autoriza a participação do seu filho se quiser e sempre estará livre para retirar essa participação a qualquer tempo, sem a necessidade de apresentar explicações. A sua decisão de não deixar seu filho participar em qualquer tempo não afetará os cuidados médicos do seu filho.

5. O que acontecerá se eu concordar que meu filho (ou menor sob minha responsabilidade) participe desta pesquisa?

Você deverá assinar este termo de consentimento para que a criança possa participar. Após assinar, nós vamos entregar um frasco onde você deverá colocar uma pequena quantidade de fezes. Você irá nos devolver o frasco para que possamos realizar os exames. Será também

necessário que você nos dê algumas informações como: nome, idade e sintomas como: diarreia ou cólica, vômito, se já é vacinado contra o rotavírus.

6. Quais são as possíveis desvantagens e riscos para quem participar?

Não há desvantagens em se participar do estudo. Você terá apenas o desconforto de colocar as fezes no potinho. A criança deve fazer “cocô” sobre um jornal e depois você deve colocar o material dentro do potinho.

7. Quais são os possíveis benefícios para quem participar?

O exame de fezes serve para saber se a criança tem algum vírus na barriga que causa diarreia e depois, se necessário, fazer o tratamento correto. O responsável pela criança também receberá informações de como as pessoas se contaminam com o rotavírus e como fazer para evitar. Você **não** irá pagar pelos exames realizados e pela consulta médica.

8. A participação do menor sob minha responsabilidade nesse estudo será confidencial?

Sim. Todas as informações sobre a criança serão usadas **apenas** para análise dos resultados pelos pesquisadores do projeto. O nome da criança e de seu responsável bem como todas as informações que você nos der não serão revelados fora das instituições de pesquisa.

9. O que acontecerá após a entrega das fezes?

Será realizado o exame de fezes e o resultado será entregue a você. O Hospital da Criança do Amapá, na Unidade de Pronto Atendimento Infantil e no Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá (LACEN-AP).

O que restou das fezes, bem como os isolados de microorganismos e amostras de RNA obtidas a partir das fezes e culturas serão armazenadas no LACEN-AP e farão parte do patrimônio genético da Instituição. Os mesmos poderão ser utilizados em estudos futuro a serem desenvolvidos no LACEN-AP e no Instituto Evandro Chagas.

10. Quem está coordenando e pagando pela pesquisa? O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde juntamente com o LACEN-AP e o Governo do Estado do Amapá.

12. Como conseguir mais informações?

Procure a equipe de técnicos do LACEN-AP/ VIROLOGIA: 096-3212-6175, Coordenação de projetos do LACEN-AP: 096-3212-6165 ou Resp. Técnica por rotavírus (autora do projeto): 96-81413610.

Leia também o que está escrito abaixo, marque com um X no quadrado ao lado do texto que você está de acordo e, em seguida, assine no local indicado ou dê a sua impressão digital.

Nome: _____ Sexo () M () F. Idade _____
 Endereço: _____ Bairro _____
 Registro do domicílio _____ Nº do RG do adulto/responsável _____

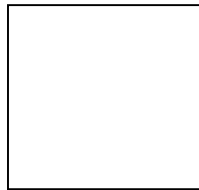
Para autorizar a PARTICIPAÇÃO DA CRIANÇA SOB SUA RESPONSABILIDADE
 marque com um "X" se concordar com os termos:

[Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim](#) sobre o estudo no termo de consentimento livre e esclarecido e tive a oportunidade de fazer perguntas. Por isso concordo que o menor, cujo nome está descrito acima, participe da pesquisa.

Local:.....,de.....de.....

Assinatura do Responsável

ou



Assinatura da pessoa que obteve o
 consentimento

Impressão digital

RUA TANCREDO NEVES, 1118 - BAIRRO SÃO LÁZARO . CEP: 68908-530.
 MACAPÁ-AP. FONE: (96) 3212-6169/3212-6165/32126175.

APÊNDICE B - FICHA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

FICHA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

Título do Projeto: IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR PARA A DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE ROTAVÍRUS A CIRCULANTES EM CRIANÇAS NO AMAPÁ EM APOIO A VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

Registro nº _____ **Data do atendimento:** ____/____/____

Categoria do Atendimento: () Demanda direcionada () Busca ativa

Classificação (Preenchimento posterior): () Grupo diarréico () Grupo controle

DADOS PESSOAIS E OCUPACIONAIS

Nome: _____

Idade: _____ **Data de Nascimento:** ____/____/____ **Sexo:** () Masculino ()

Feminino

Filiação:

Pai: _____

Mãe: _____

Cidade de nascimento: _____

UF: _____

DADOS DE MORADIA E DE CONDIÇÕES DE HABITAÇÃO

Endereço: _____ **nº** _____

Bairro: _____

Cidade: _____ **UF:** _____

Zona: () Urbana () Rural **Tempo de moradia atual** _____ (anos) **Nº de co-habitantes:** _____

Tipo de edificação: () Alvenaria () Madeira () Enchimento () Mista ()

Outros: _____

Tipo de terreno: () Firme (Seco) () Alagado

Forma de abastecimento de água no domicílio: () Rede Pública () Poço escavado/aberto

() Poço artesiano () Rio/igarapé/lago () Outros: _____

Origem da água de consumo: () Rede Pública () Poço () Rio/Igarapé () Mineral

Tratamento da água de consumo: () Sim () Não Qual? _____

Destino dos dejetos: () Rede geral de esgoto () Fossa séptica () Fossa rudimentar () Rio/igarapé

() Outros: _____

Destino do lixo: () Coleta pública () Queimado () Enterrado () Céu Aberto () Outros: _____

HÁBITOS ALIMENTARES

Faz refeições fora de casa? () Sim () Não **Frequência (vezes):** _____ Semanal
_____ Mensal

Nos últimos dias comeu algum alimento que possa ter feito mal: () Sim () Não

Qual? _____ Onde? _____

Aleitamento materno: () Sim - Por quanto tempo _____ () Não

Quando costuma lavar as mãos:

Antes de preparar os alimentos: () Sim () Não. Depois de usar o banheiro: () Sim () Não

Depois de trocar as fraldas do bebê: () Sim () Não

Tempo de preparo dos alimentos ofertados a criança:

Prepara os alimentos com mais de 2 horas de antecedência: () Sim () Não

Oferece alimentação preparada de véspera (+ de 24h) () Sim () Não

Oferece sobra (refeição anterior) de alimentos para a criança () Sim () Não

Uso de mamadeira:

Alimenta o bebê com mamadeira: () Sim () Não

Como lava a mamadeira: () Com água e sabão () Com água, sabão e escova apropriada

() Com água, sabão, escova apropriada e fervura. Tempo fervura _____

Outro produto esterilizante: _____

Tempo: _____

HISTÓRIA DA DOENÇA ATUAL

Ausentou-se da cidade que mora nos últimos 30 dias? () Sim () Não

Em caso afirmativo. Qual a cidade ou município?

UF: _____

Há outro caso na casa? () Sim () Não Quantos?

Esteve hospitalizado? () Sim () Não Quantas vezes? () 1 () 2 () 3

Fez uso de antibióticos/antiparasitário? () Sim () Não Há quanto tempo?

Se afirmativo. Qual? () Cloranfenicol () Ampicilina () Ciprofloxacina () Amicacina

() Benzetacil () Vancomicina () Sulfametoxazol com trimetoprima

() Metronidazol () Mebendazol () Outros:

Tomou vacina contra rotavírus? () Não () Sim 1 dose () Sim 2 doses ()

Procedência: _____

SINTOMATOLOGIA

Está com febre: () Não () Sim Início: ____/____/____ duração: ____ dias

Está com vômitos: () Não () Sim Início: ____/____/____ duração: ____ dias

Teve febre? () Não () Sim Início: ____/____/____ Término: ____/____/____

duração: ____ dias

Esta com diarreia? () Não () Sim Início: ____/____/____ duração:

____ dias

Teve Diarreia? () Não () Sim Início: ____/____/____ Término: ____/____/____

duração: ____ dias

Número de evacuações/dia (24 horas): _____

Outros Sintomas: (Marque com X os sintomas presentes)

() Tosse seca () Tosse Produtiva

- Cefaléia Calafrios Náuseas Dor abdominal
 Constipação Icterícia Mialgia Artralgia Prostração
 Anorexia Oligúria Dor retro-orbitária
 Exantema Petéquias Desidratação
 Distensão abdominal Coriza Sangue nas fezes
 Hepatomegalia Esplenomegalia Déficit sensitivo/motor
 Dissociação pulso/temperatura Conjuntivite

ESTADO NUTRICIONAL

Peso: _____ **Altura:** _____

- Eutróficas** (P/A e A/I normais) **Desnutrido agudo** (P/A \leq -2 A/I normal)
 Desnutrido progressivo (P/A normal e A/I \leq -2) **Obesas** (P/A \geq 2)

RESULTADO DA AVALIAÇÃO DAS FEZES

Vírus

Rotavírus Reagente Não reagente

Outros patógenos observados: _____

APÊNDICE – C – MODELO DE POP Critérios de seleção e envio de espécimes fecais para pesquisa de rotavírus AO lacen/ap

LOGOMARCA DO SERVIÇO DE SAÚDE	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	POP 0.00.00.00
		Revisão: 0
		Folha: 82 / 123
Título: CRITÉRIOS DE SELEÇÃO E ENVIO DE ESPÉCIMES FECAIS PARA PESQUISA DE ROTAVÍRUS AO LACEN/AP		

Revisão: 0 Data: 00/00/2016 Motivo: Primeira emissão

Elaborado por: Júlia Pantoja Marques
Farmacêutica-Bioquímica

Referências:	PGP 3.04.00.01 Diagnóstico Laboratorial de Agravos
Executante da atividade:	Profissionais de enfermagem e analistas de laboratório.
Hora/freqüência de execução:	Quando houver pacientes de até 5 anos com suspeita clínica de rotavírus.
Local de execução:	Laboratório do serviço de saúde.
Resultado esperado:	Seleção de amostra de espécimes fecais em condições adequadas para envio ao LACEN para realização de pesquisa de rotavírus.
Equip. e materiais necessários:	Caixa Térmica com gelo reciclável; Coletor universal; Ficha de identificação, etiquetas e caneta; Papel toalha; Hipoclorito; Gaze;
EPI necessários:	Luvas descartáveis; Máscara; Jaleco.
Cuidados Especiais	- Seguir os cuidados especiais da norma de biossegurança.

Passos:

1. Fundamento do procedimento

A qualidade dos resultados dos exames laboratoriais está intimamente relacionada à fase pré-analítica, que se inicia desde o preenchimento correto da requisição, preparação do paciente, coleta e

identificação da amostra, armazenamento temporário da amostra no local de coleta, transporte ao laboratório, até o recebimento e cadastramento das amostras no Lacen. Esta fase deve ser criteriosamente definida e constantemente monitorada em razão do impacto significativo das atividades realizadas durante este processo sobre a qualidade do resultado liberado.

2 Frascos de Coleta

Em coletor universal estéril.

3 Procedimento de Coleta

3.1 A colheita do espécime fecal deve ser realizada entre o primeiro e o quarto dia do aparecimento da diarreia.

3.2 Nos casos de crianças em uso de fraldas descartáveis, os profissionais de enfermagem devem orientar os pais a forrar a fralda com gaze para melhor aproveitamento da amostra e acondicionar no coletor universal;

3.3 Acondicionar as amostras de forma a evitar vazamento e contaminação tanto no frasco de coleta como na caixa térmica para o envio;

3.4 As amostras devem ser mantidas sob refrigeração e encaminhadas ao LACEN em até 48 horas após a coleta

4. Critérios de aceitação/rejeição de amostra

4.1. Aceitação:

- A amostra deverá estar refrigerada, devidamente identificada, lacrada e acompanhada da ficha epidemiológica e solicitação médica (Após o prazo de 24 horas, se a amostra não for enviada ao LACEN, deve ser congelada);

- A amostra deverá ser transportada em caixa térmica com gelo reciclável;

- As requisições de amostras fecais devem estar preenchidas adequadamente, sem rasuras e com as condições a seguir:

- a) Com letra legível;
- b) Com nome e endereço completo do paciente e telefone para contato (se houver);
- c) Data de nascimento, idade e sexo,
- d) Nome e carimbo do solicitante;


- e) Exame solicitado.

4.2. Rejeição:

As amostras fecais deverão ser rejeitadas quando encontrarem-se nas condições a seguir:

- a) Material mal acondicionado;
 - b) Identificação incorreta ou incompleta;
 - c) Material sem requisição de exame;
 - d) Requisição de exame sem material;
 - e) Falta de ficha de investigação epidemiológica;
 - f) Transporte em temperatura inadequada;
 - g) Transporte em recipiente inadequado;
 - h) Amostra com coleta inoportuna para o exame solicitado;
 - i) Amostra chegou derramada ou quebrada;
 - j) Amostra apresentou pendências documentais e será retida no Serviço de Gerenciamento de Amostras Biológicas.
-

APÊNDICE – D – POP DE ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		POP	3.04.02.86
		Revisão:	0
		Folha:	84 / 4
Título: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE			
Revisão: 0	Data: 01/02/2016	Motivo: Primeira emissão	
Elaborado por: Júlia Pantoja Marques Farmacêutica-Bioquímica		Aprovado por:	Edcelha Soares D'Athaide Ribeiro Chefe do Laboratório de Virologia

Referências:	<p>PGP 3.04.00.01 Recebimento, análise e processamento de amostras biológicas.</p> <p>Banerjee I, et al. Modification of rotavirus multiplex RT-PCR for the detection of G12 strains based on characterization of emerging G12 rotavirus strains from South India. J. Med. Virol., 2007, v. 79, nº 9, p.1413-1421.</p> <p>Gentsch <i>et al.</i> Identification of group A rotavirus gene 4 types by polimerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., 1992; v. 30, nº 6, p.1365-1373.</p> <p>Gouvêa <i>et al.</i> Polimerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. J. Clin. Microbiol., 1990; v. 28, nº 2, p.276-282.</p> <p>Iturriza-Gómara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. J. Clin. Virol., 2004; v. 31, nº4, p.259-265.</p> <p>Leite <i>et al.</i> Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. Arch. Virol., 1996, v. 141, nº 12, p.2365-2374.</p>
Executante da tarefa:	<p>a) Profissional de nível superior responsável pelo Rotavírus: supervisão, controle de qualidade, e interpretação dos resultados.</p> <p>b) Profissionais de nível superior treinados: execução da RT-PCR e emissão de resultado dos exames realizados no LACEN/AP</p>
Hora/freqüência de execução:	07:00h às 13:00h e 14:00h às 18:00h. De segunda a sexta feira.
Local de execução:	Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Virologia.
Resultado esperado:	Validação do ensaio e o laudo liberado em tempo hábil.

- Equipamentos:
- Geladeira a 4°C;
 - Freezer -20°C ou -70°C;
 - Cuba de eletroforese horizontal;
 - Fonte de eletroforese;
 - Sistema de fotodocumentação

- Materiais necessários:
- EPIs (jaleco, luvas, máscara, propé, gorro e óculos);
 - Micropipeta e ponteiros descartáveis de 10µL;
 - Parafilme;
 - Abridor de microtubos

- Cuidados especiais:
- Utilizar equipamentos de proteção individual: luvas, jaleco, máscara, gorro e óculos de proteção.
 - As micropipetas devem ser limpas com etanol 70%,

Documentos complementares: Protocolo de identificação das amostras

Passos / Atividades:

1. OBJETIVO

Realização da técnica de eletroforese em gel de Agarose para visualização dos amplicons.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Diagnóstico de infecção por rotavírus a partir de espécime fecal proveniente de seres humanos após a extração dos dsRNA viral.

3. TERMINOLOGIA / SIGLAS E DEFINIÇÕES

EGPA: Eletroforese de gel de Poliacrilamida

4. PROCEDIMENTO

4.1 TÉCNICA

4.2.1. Montar a cuba de eletroforese horizontal de acordo com a orientação do fabricante.

4.2.2. Pesar 1,5% de agarose de acordo com o tamanho da cuba e o número de amostras a serem testadas (Ex.: para 100 mL de TBE 1X pesar 1,5g de agarose).

4.2.3. Adicionar a agarose o tampão TBE 1X e pesar novamente essa mistura

4.2.4. Aquecer esta solução em microondas até que toda agarose seja dissolvida (1 a 2 minutos).

4.2.5. Levar a agarose novamente à balança e completar com água mili-Q até o volume inicial (Ex.: 100 mL).

4.2.6. Deixar o gel esfriar um pouco e adicionar Syber Safe ou Gel Red na concentração de 1%

4.2.7. Depositar a solução de agarose na cuba de eletroforese previamente montada e verificar a formação de bolhas. Caso tenha formado retirá-las usando a base de uma ponteira e encostando com cuidado no gel

4.2.8. Esperar solidificar (cerca de 15 minutos).

4.2.9. Retirar o pente dos poços no gel.

4.2.10. Cortar um pedaço de parafilme e aplicar 2 μ L de tampão carreador (Gel Loading Solution) tantas vezes forem o número de amostras

4.2.11. Aplicar 6 a 10 μ L de cada produto da RT-PCR ou da Nested-PCR juntamente com 2 μ L de tampão carreador (Gel Loading Solution) e depositar todo o conteúdo nos orifícios do gel.

4.2.12. Aplicar 2 μ L de peso molecular de 123 pb ou 0.6 μ L se for o peso de 50 pb o de 100 pb juntamente com 2 μ L de tampão carreador (Gel Loading Solution) e depositar todo o conteúdo no 1º orifício do gel.

4.2.13. Adicionar o tampão de corrida (TBE1X) na cuba até cobrir o gel.

4.2.14. Encaixar a tampa e conectar os *plugs* (vermelho e preto) na cuba e posteriormente na fonte.

4.2.15. Ligar a fonte e selecionar a corrente: 120 V, 400W e 50 minutos.

4.2.16. Deixar que as amostras corram até o início do terço final do gel.

4.2.17 Visualizar os fragmentos amplificados em sistema de fotodocumentação ou transiluminador UV.

4.3 REAGENTES

Tampão Tris-borato-EDTA (TBE 1X)

Tampão carreador (Gel Loading Solution)

Peso molecular de 50 ou 100pb

4.4 PREPARO DE REAGENTES

a) Tampão TBE 10X Tris-base

Tris-base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA 0,5 M, pH 8,0	40 mL
Água destilada q.s.p	1000 mL

Diluir para uso essa solução 1X antes do uso.

CONTROLE DE REGISTO

Identificação	Coleta	Indexação	Acesso	Arquivamento	Armazenamento	Manutenção	Disposição
Ficha de trabalho GAL	Atendimento (Triagem LACEN)	Nº do registro da amostra.	Analistas e técnicos	Laboratório de Virologia	Prateleira em pastas registrador	1 ano no laboratório e 4 no arquivo morto.	Lixeira de resíduo comum.
Protocolo de ensaio	Laboratório de Virologia	Nº do registro da amostra.	Analistas e técnicos	Laboratório de Virologia	Prateleira em pastas suspensas	1 ano no laboratório e 4 no arquivo morto.	Lixeira de resíduo comum.

- Materialis necessários:
- EPIs (jaleco, luvas, máscara, propé, gorro e óculos);
 - Microtubos de 200µL, 500µL e 1,7µL;
 - Caneta para microtubos
 - Estante para microtubos;
 - Recipiente contendo gelo;
 - Micropipeta e ponteiras descartáveis de 10, 50, 200, 1000µL;
 - Hipoclorito de sódio a 5%;
 - Gaze;
 - Abridor de microtubos
- Cuidados especiais:
- Utilizar equipamentos de proteção individual: luvas, jaleco, máscara, gorro e óculos de proteção.
 - As micropipetas devem ser limpas com etanol 70%,
- Documentos complementares: Protocolo de identificação das amostras para EGPA.
- Passos / Atividades:

5. OBJETIVO

Realização da técnica de eletroforese em gel de Poliacrilamida (EGPA) para a classificação do perfil eletroforético de rotavírus.

6. CAMPO DE APLICAÇÃO

Diagnóstico de infecção por rotavírus a partir de espécime fecal proveniente de seres humanos após a extração dos dsRNA viral.

7. TERMINOLOGIA / SIGLAS E DEFINIÇÕES

EGPA: Eletroforese de gel de de Poliacrilamida

8. PROCEDIMENTO

8.1 FUNDAMENTO DO MÉTODO

Pequenos fragmentos de ácidos nucleicos (< 1000 pb) podem ser separados pela EGPA e devido ao genoma do rotavírus apresenta-se segmentado, podem ser visualizados através desta técnica.

8.2 TÉCNICA

- a) Montar o recipiente (placas de vidro e espaçadores) onde se formará o gel.
- b) Preparar a mistura do gel, de acordo com o Quadro 1 e reservar a temperatura ambiente.

Quadro 1 – Reagente para reparo de gel de poliacrilamida

REAGENTES	CUBA PEQUENA (para 2 géis pequenos)	CUBA GRANDE (para 4 géis pequenos)
Acrilamida/Bis-acrilamida	3,32 mL	6,64 mL
Tris base	3,74 mL	7,48 mL
Água destilada	12,56 mL	25,12 mL
Persulfato de amônia 10%*	400 µL	800 µL
TEMED*	20 µL	40 µL

- c) Colocar a mistura dentro do recipiente de formação do gel;
- d) Inserir o pente e guardar a polimerização (cerca de 15 minutos);
- e) Após a polimerização, retirar o pente e lavar com água destilada;
- f) Montar as placas com o gel polimerizado na cuba de eletroforese e fixar com grampos;
- g) Preparar o tampão de eletroforese, de acordo com o Quadro 2.

Quadros 2 – Reagentes para o preparo do tampão de eletroforese

REAGENTES	CUBA PEQUENA	CUBA GRANDE
Tampão tris glicina 10X	10 mL	25mL
Água destilada q.s.p.	100 mL	250mL

- h) Colocar o tampão de corrida no reservatório
- i) Aplicar 2µL de azul de bromofenol juntamente com 10µL da amostra a cada orifício do gel.
- j) Conectar os plugs (vermelho e preto) na cuba e posteriormente conectá-los na fonte.
- l) Selecionar na fonte: 100V, 21mA, 100W. Deixar por 2 horas (cuba pequena) e 4 horas e meia (gel grande).
- m) Retirar o gel entre as placas após o tempo de corrida e colocá-lo em um recipiente de vidro.
- n) Preparar os seguintes reagentes em provetas separadas:

FIXADOR

REAGENTES	CUBA PEQUENA	CUBA GRANDE
Étanol PA	10mL	20mL
Ácido acético PA	0,5mL	1mL
Água destilada q.s.p.	100mL	200mL

CORANTE

REAGENTES	CUBA PEQUENA	CUBA GRANDE
Nitrato de prata	1mL	2mL
Água destilada q.s.p.	100mL	200mL

REVELADOR

REAGENTES	CUBA PEQUENA	CUBA GRANDE
Hidróxido de sódio 10M	7,5mL	15mL
Formaldeído PA	0.8mL	1.6mL
Água destilada q.s.p.	100mL	200mL

SOLUÇÃO PARA PARAR A REAÇÃO

REAGENTES	CUBA PEQUENA	CUBA GRANDE
Etanol PA	5mL	10mL
Água destilada q.s.p.	100mL	200mL

- o) Colocar o fixador juntamente com o gel e deixar em agitador orbital a TA por 20 minutos.
- p) Desprezar o fixador, adicionar o corante e deixar em agitador orbital a TA novamente por 20 minutos.
- q) Desprezar o corante e lavar duas vezes com água destilada.
- r) Adicionar cerca de 50mL do revelador, para tirar o excesso do corante, e desprezá-lo.
- s) Adicionar o restante do revelador e levar o gel ao negatoscópio pra visualização do perfil eletroforético de rotavírus.
- t) Após o aparecimento das bandas, desprezar o revelador e adicionar a solução para parar a reação.

4.3 REAGENTES

- a) Acrilamida;
- b) Bis-acrilamida;
- c) Tris base;
- d) TEMED;
- e) Persulfato de amônio 10%;
- f) Etanol PA;

- g) Água destilada;
- h) Azul de bromofenol;
- i) Tampão Tris glicina 10x;
- j) Ácido acético PA;
- k) Nitrato de prata;
- l) Formaldeído 37%;
- m) Hidróxido de sódio 10M;

4.4 PREPARO DE REAGENTES

a) Acrilamida/Bis-acrilamida 30:0,8

N'N'-metileno-bisacrilamida	0,8 g
Acrilamida	30 g
Água milli-Q q.s.p	100 mL

Adicionar acrilamida a 50 mL de água destilada e homogeneizar. Acrescentar N'N'-metileno-bisacrilamida e dissolvê-lo. Completar com água até o volume final e filtrar. Armazenar em recipiente transparente e estocar a 4°C.

b) Tris base 2M pH 8,8

Tris-base	24,2 g
Água milli-Q q.s.p	100 mL

Adicionar a 50 mL de água destilada 24,2 g de tris-base e homogeneizar. Completar com água até o volume final. Ajustar para pH 8,8 com ácido clorídrico (HCl) 1M e filtrar. Armazenar em recipientes transparentes e estocar a 4°C.

c) Tampão Tris Glicina 10X

Tris-base	24,0 g
Glicina	115,3 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

d) Nitrato de prata

Nitrato de prata (Sigma)	5,5g
Água destilada q.s.p	30 mL

Armazenar em recipiente de vidro âmbar a 4,0 °C.

e) Azul de bromofenol

Azul de bromofenol	0,25%
Glicerol	20%
Água milli-Q q.s.p	100 mL

f) Persulfato de amônio 10%

Persulfato de amônio	1 g
Água milli-Q q.s.p	10 mL

Em 10 mL de água destilada, adicionar persulfato de amônio. Homogeneizar, armazenar em recipiente transparente e estocar a 4°C.

g) Hidróxido de sódio 10M


Hidróxido de sódio	40 g
Água destilada q.s.p	100 mL

Armazenar em recipiente de plástico a TA.

CONTROLE DE REGISTROS

Identificação	Coleta	Indexação	Acesso	Arquivamento	Armazenamento	Manutenção	Disposição
Ficha de trabalho GAL	Atendimento (Triagem LACEN)	Nº do registro da amostra.	Analistas e técnicos	Laboratório de Virologia	Prateleira em pastas registrador	1 ano no laboratório e 4 no arquivo morto.	Lixeira de resíduo comum.
Protocolo de ensaio	Laboratório de Virologia	Nº do registro da amostra.	Analistas e técnicos	Laboratório de Virologia	Prateleira em pastas suspensas	1 ano no laboratório e 4 no arquivo morto.	Lixeira de resíduo comum.

APÊNDICE – F – POP DE REALIZAÇÃO DA NESTED-PCR PARA GENOTIPAGEM DE ROTAVÍRUS

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	POP	3.04.02.88
		Revisão:	0
		Folha:	94 / 4
Título:	REALIZAÇÃO DA NESTED-PCR PARA GENOTIPAGEM DE ROTAVÍRUS		

Revisão: 0 Data: 01/02/2016 Motivo: Primeira emissão

Elaborado por:	Júlia Pantoja Marques Farmacêutica-Bioquímica	Aprovado por:	Edcelha Soares D'Athaide Ribeiro Chefe do Laboratório de Virologia
----------------	--	---------------	--

Referências:

PGP 3.04.00.01 Recebimento, análise e processamento de amostras biológicas.

Banerjee I, et al Modification of rotavirus multiplex RT-PCR for the detection of G12 strains based on charecterization of emerging G12 rotavirus strains fron South India. **J. Med. Virol.**, 2007, v. 79, nº9, p. 1413-1421.

Gentschet al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polimerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 1992: v.30,nº 6, p. 1365-1373.

Gouvêa et al. Polimerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimes. **J. Clin. Microbiol.**, 1990; v. 28, nº2, p. 276-282.

Iturriza-Gómara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. **J Clin Virol.**, 2004; v. 31, nº4, p.259-265.

Leite et al. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: Characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. **Arch. Virol.**, 1996, v. 141, nº12, p. 2365-2374.

Executante da tarefa: e) Profissional de nível superior responsável pelo Rotavírus: supervisão, controle de qualidade, e interpretação dos resultados.

- f) Profissionais de nível superior treinados: execução da RT-PCR e emissão de resultado dos exames realizados no LACEN/Ap

Hora/freqüência de execução: 07:00h às 13:00h e 14:00h às 18:00h. De segunda a sexta feira.

Local de execução: Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Virologia.

Resultado esperado: Validação do ensaio e o laudo liberado em tempo hábil.

Equipamentos:

- Geladeira a 4°C;
- Freezer -20°C ou -70°C;
- Micro “spin”;
- Câmara asséptica para PCR;
- Termociclador;
- Agitador de tubos orbitais

Materiais necessários:

- EPIs (jaleco, luvas, máscara, propé, gorro e óculos);
- Microtubos de 200µL, 500µL e 1,7µL;
- Estante para microtubos;
- Recipiente contendo gelo;
- Micropipeta e ponteiros descartáveis de 10, 50, 200, 1000µL;
- Hipoclorito de sódio a 2,5%;
- Cooler;
- Gaze;
- Abridor de microtubos

Cuidados especiais:

- Utilizar equipamentos de proteção individual: luvas, jaleco, máscara, gorro e óculos de proteção.
- As micropipetas devem ser limpas com etanol 70%,
- O procedimento deve ser realizado em cabine de fluxo laminar classe A2,
- Antes e após o procedimento a cabine de fluxo laminar deve ser limpa com hipoclorito a 2,5% e esterilizada por ação da luz UV durante 10 minutos.

Documentos

Protocolo de identificação das amostras para Nested-PCR.

complementares:

Passos / Atividades:

9. OBJETIVO

Realização da Técnica de “Nested-PCR” para genotipagem de rotavírus..

10. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este POP aplica-se as amostras fecais oriundas das redes sentinelas de rotavírus prestados pelo Serviço de virologia do Laboratório de Referência do Estado do Amapá.

11. TERMINOLOGIA / SIGLAS E DEFINIÇÕES

- a) dsRNA: ácido ribonucléico viral de fita dupla;
- b) cDNA: DNA complementar;
- c) pb: pares de base;
- d) primers ou iniciadores: pequena seqüência de RNA com ate 20 nucleotídeos;
- e) Beg9(+)/End9(-): “primers” para amplificar uma região de 1062pb do gene VP7;
- f) 4con3(+)/4con2(-): “primers”para amplificar uma região de 875pb do gene VP4;
- g) μ L: microlitro;
- h) nm: nanomoles;
- i) μ M: micromolar;
- j) $^{\circ}$ C: graus Celsius;
- k) EPI: equipamento de proteção individual;
- l) RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa;
- m) TBE: tampão Tris-borato-EDTA;
- n) MQ: milli-Q;
- o) dNTPs: desoxiribonucleotídeos;

12. PROCEDIMENTO

12.1 FUNDAMENTO DO MÉTODO

A Nested-PCR é uma técnica que emprega uma segunda etapa de amplificação com um iniciador utilizado na primeira etapa, no caso RT-PCR, com iniciadores internos do gene em estudo e visa aumentar a sensibilidade especificidade do método.

12.2 – DESCRIÇÃO DOS INICIADORES (“ PRIMERS”)

Uma mistura de 1 μ L de primers para deecção dos genótiposo G e P de rotavírus na concentração de 20 μ M são usados visando amplificar fragmentos específicos de acordo com o descrito no Quadro 1.

Quadro 1 Sequência dos primers utilizados na Nested-PCR para caracterização molecular dos tipos G e P de rotavírus.

Primer	Sequência	Gene	Tamanho amplicon (pb)	Referência
End 9 (-)	GGT CAC ATC ATA CAA TTC T	VP7	-	Gouvea,1990
BT1 (+) G1	CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G	VP7	749	Gouvea,1990
CT2 (+) G2	CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT	VP7	652	Gouvea,1990
DT4 (+) G3	G	VP7	374	Gouvea,1990
ET3 (+) G4	CGT TTG AAG AAG TTG CAA CAG	VP7	583	Gouvea,1990
FT9 (+) G9	CGT TTC TGG TGA GGA GTT G	VP7	306	Gouvea,1990
G12 (+)	CTA GAT GTA ACT ACA ACT AC	VP7	515	Banerjee, 2007
4con 3 (+)	CCG ATG GAC GTA ACG TTG TA	VP4	-	Gentsch, 1992
P[8] (-) deg	TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A	VP4	345	Iturriza-Gómara, 2000
2T-1 (-) P[4]	TCT ACT GGR ^a TTR ^a ACN ^b TGC	VP4	483	Gentsch, 1992
3T-1 (-) P[6]	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	VP4	267	Gentsch, 1992
4T-1 (-) P[9]	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA TGA GAC ATG CAA TTG GAC	VP4	391	Gentsch, 1992

^aR= A ou G
^bN= A, G, C ou T

12.3 – SALA DA MIX (SALA LIMPA)

- a) Esterilizar a sala de preparo da mistura por meio de luz UV por 10 minutos.
- b) Identificar os microtubos a serem usados na reação.
- c) Com o jaleco de transporte, pegar gelo picado na sala de esterilização, colocar no recipiente de transporte e transferir este gelo para o recipiente da sala de mix.
- d) Retirar todos os reagentes necessários do freezer -70°C e transportá-lo até a sala de mix.
- e) Descongelar os reagentes e colocá-los no gelo.
- f) Em um microtubo estéril preparar a mistura da reação para o cDNA e para a RT-PCR de acordo com os reagentes constantes na tabela 1.
- g) Aliquotar 24µL da mistura em cada tubo previamente identificado.
- h) Transferir os microtubos para o recipiente de transporte com gelo e levar para a sala de biologia molecular.

Tabela 1- Sequências dos iniciadores utilizados na Nested-PCR para caracterização molecular dos tipos G e P de rotavírus.

Tabela 1 – Reagentes necessários para realização da Nested-PCR

REAGENTES	Nested Por reação em μL
Produto da RT-PCR*	2
dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) 2,5mM	2
Tampão 10X sem magnésio	2.5
MgCl ₂ 50mM	1
Primer consensual: tipo G (RVG9) ou P (4con3)	1
Pool de <i>primers</i> específicos: tipo G ou P*	1
Taq DNA polimerase 5 U/ μL	0,25
Água DNase/RNase free	23

* Será adicionado na sala de amplificação extração

12.4 – SALA DE BIOLOGIA MOLECULAR

- Na câmara de PCR adicionar 2 μL do produto da RT-PCR em cada microtubo correspondente a amostra;
- Centrifugar os tubos a 13.000 rpm por 20 segundos;
- Levar os microtubos para o termociclador sob as seguintes ciclos de amplificação:

94°C por 2 minutos	Ciclo de desnaturação inicial:
94°C por 30 segundos	
50°C por 30 segundos	35 ciclos de amplificação
72°C por 1 minuto	
72°C por 10 minutos	Ciclo de extensão final
4°C	

- Armazenar os produtos da reação em freezer -20°C e posteriormente analisá-los em gel de agarose a 1,5% para a visualização dos amplicons
- Caso não seja visualizado os amplicons desta reação, o processamento da amostra será repetido desde a etapa da extração;
- Cada amostra poderá ser repetida até 3 vezes para a obtenção do genótipo. Caso não seja obtido o amplicon, o resultado da amostra será emitido como não tipado (NT).

OBS1: O pool de primers irá depender do gene a ser testado como descrito a seguir:

1. Gene VP7 para o tipo G de rotavírus (origem humana): iniciadores Beg9(+)/End9(-);
2. Gene VP4 para o tipo P de rotavírus (origem humana): iniciadores 4con3(+)/4con2(-);

4.4 – PREPARO DE REAGENTES

✓ Reidratação de iniciadores ou primers liofilizados (sala limpa);

1. Fazer o cálculo para a reidratação do iniciador com base na quantidade de nanomoles contida no frasco de forma a deixá-lo na concentração de 200µL.

Exemplo de reidratação do prime 4con3 liofilizado com base na concentração de 59,4 nanomoles: $59,4/200 \times 100 = 297\mu\text{L}$.

2. Centrifugar o iniciador liofilizado por 1 minuto a 13.000rpm de forma a retirar qualquer resíduo da parede ou tampa do frasco;
3. Reidratar com 297µL de água livre de DNase/RNase.
4. Agitar em agitador de tubos e deixar no gelo ou geladeira durante 15 minutos;
5. Rotular os tubos onde irão ficar os primers diluídos com data e concentração;
6. Aliquotar aproximadamente 50µL e estocar os mesmos a -70°C.

✓ Diluição dos DNTPs

1. Os 4 DNTPs ESTÃO NA CONCENTRAÇÃO DE 100Mm CADA;
2. Diluir os DNTPs para a concentração final de 2,5mM adicionando 9mL de água livre de DNase/RNase e 250µL de cada DNTP, totalizando 10mL;
3. Fazer alíquotas do DNTP 2,5mM e estocá-los a -70C;

OBS.: Todos esses reagentes deverão ser diluídos na sala limpa, onde é estritamente proibida a entrada, devido a possíveis contaminantes.

CONTROLE DE REGISTROS

Identificação	Coleta	Indexação	Acesso	Arquivamento	Armazenamento	Manutenção	Disposição
Ficha de trabalho GAL	Atendimento (Triagem LACEN)	Nº do registro da amostra.	Analistas e técnicos	Laboratório de Virologia	Prateleira em pastas registrador	1 ano no laboratório e 4 no arquivo morto.	Lixeira de resíduo comum.
Protocolo de ensaio	Laboratório de Virologia	Nº do registro da amostra.	Analistas e técnicos	Laboratório de Virologia	Prateleira em pastas suspensas	1 ano no laboratório e 4 no arquivo morto.	Lixeira de resíduo comum.

APÊNDICE – G – POP DE PREPARO DA SUSPENSÃO FECAL

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		POP	3.04.02.89
			Revisão:	0
			Folha:	100 / 4

Título: **PREPARO DA SUSPENSÃO FECAL**

Revisão: 0 Data: 01/02/2016 Motivo: Primeira emissão

Elaborado por: Júlia Pantoja Marques Farmacêutica-Bioquímica	Aprovado por: Edcelha Soares D'Athaíde Ribeiro Chefe do Laboratório de Virologia
---	---

Referências: PGP 3.04.00.01 Recebimento, análise e processamento de amostras biológicas.

BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, M.M.M. et al. Rapid and simple method for purifications of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.**, 28: 495-503, 1990.

Executante da tarefa: Analista laboratorial de nível superior e nível médio do Serviço de Virologia responsável pelo Rotavírus.

Hora/freqüência de execução: 07:00h às 13:00h de segunda a sexta feira.

Local de execução: Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Virologia.

Resultado esperado: Validação do ensaio e o laudo liberado em tempo hábil.

Equipamentos:

- Geladeira a 4°C,
- Freezer -20°C ou -70°C,
- Cabine de fluxo laminar tipo 2,
- Microcentrifuga refrigerada,
- Balança analítica para pesagem de reagentes,
- Agitador de tubos orbital,

Materiais necessários:

- EPIs (jaleco, luvas, máscara, gorro e óculos),
- Tubos de fundo cônico de poliestireno com capacidade para 2,0 mL,
- Estante para tubos,
- Palito de madeira,
- Micropipeta de 50 - 1000µL,
- Frasco de plástico com rosca,
- Relógio digital,
- Gaze,
- Abridor de tubos

Cuidados especiais:

- Utilizar equipamentos de proteção individual: luvas, jaleco, máscara, gorro e óculos de proteção.
- As micropipetas devem ser limpas com etanol 70%,
- O procedimento deve ser realizado em cabine de fluxo laminar classe A2,
- Antes e após o procedimento a cabine de fluxo laminar deve ser limpa com hipoclorito a 2,5% e esterilizada por ação da luz UV durante 10 minutos.

Documentos

Protocolo de armazenamento da suspensão fecal.

complementares:

Passos / Atividades:

13. OBJETIVO

Preparo de suspensão fecal para realização de exames no laboratório de virologia.

14. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se à pesquisa de rotavírus pelas técnicas imunoenzimáticas, aglutinação em látex e moleculares, a partir de espécimes fecais recebidas no LACEN/AP.

15. TERMINOLOGIA / SIGLAS E DEFINIÇÕES

- a) Sedimentos: componentes da solução que ficaram no fundo do tubo após a centrifugação.
- b) Sobrenadante: solução acima do sedimento.
- c) μL : microlitro.
- d) r.p.m.: rotação por minuto.
- e) q.s.p.: quantidade suficiente para.
- f) EPIs: equipamento de proteção individual.
- g) UV: ultravioleta.
- h) TA: temperatura ambiente.
- i) POP: Procedimento Operacional Padrão.
- j) P.A.: para análise.
- k) $^{\circ}\text{C}$: grau Celsius.
- l) mL : mililitro.

16. PROCEDIMENTO

16.1 FUNDAMENTO DO MÉTODO

Sob ação da centrifugação os espécimes fecais serão separados em sedimento e sobrenadante, este último a ser usado nos ensaios de triagem.

16.2 – AMOSTRAS

Espécimes fecais

4.3 - Reagentes

- Tris/HCl/Ca⁺⁺0,01M pH 7.2 ; Água destilada; Água livre de DNase/RNase,
- Etanol a 70%; Solução de hipoclorito de sódio 5%.

4.5 - Técnica

- g) Com o auxílio de EPIs (jaleco, máscara, gorro e óculos) iniciar o procedimento;
- h) Retirar as amostras fecais do -20°C ou -70°C e deixar descongelando a TA;
- i) Colocar na cabine de fluxo laminar todo o material necessário para o procedimento como pipetas, microtubos, estantes, ponteiros, palito de madeira, abridor de tubos, gaze, etc e esterilizar por meio de UV por 10 minutos;
- j) Identificar microtubos estéreis de 2,0mL com o registro correspondente ao da suspensão fecal a ser preparada;
- k) Separar dois tubos para cada espécime fecal. No primeiro escrever apenas o número do registro e no segundo, fazer o rotulo contendo: número do registro, iniciais do paciente, data de coleta das fezes e data de preparo da suspensão fecal;
- l) Adicionar aos primeiros microtubos 1,0 mL da solução Tris/HCl/Ca⁺⁺0,01M Ph 7.2;
- m) Com auxílio de gaze abrir o frasco contendo as fezes e com o palito de madeira homogeneizar as fezes retirando aproximadamente 0,1g de fezes, em caso de fezes líquida: adicionar 0,1mL da amostra;
- n) Transferir o palito de madeira contendo as fezes para o frasco com Tris correspondente ao registro e ir homogeneizando devagar pela parede do tubo;
- o) Homogeneizar vigorosamente a suspensão em agitador de tubos (vortex);
- p) Centrifugar a 4000 r.p.m. por 10 minutos a temperatura de 4°C;
- q) Transferir o sobrenadante (0,8mL) com auxílio de uma pipeta para o frasco correspondente rotulado e desprezar o restante em um recipiente para descarte de material contaminado contendo solução de hipoclorito de sódio a 5%;
- r) Acondicionar a suspensão fecal a 4°C até ser submetida aos ensaios de triagem. Após os ensaios deve ser armazenada em freezer a -20°C ou a -70°C;
- s) O recipiente contendo as fezes deverá ser guardado preferivelmente a -70°C ou a -20°C;
- t) Ao término do procedimento, limpar as micropipetas com etanol a 70%, a cabine de fluxo laminar com hipoclorito de sódio a 2,5% e esterilizar por ação de luz UV durante 10 minutos.

Em caso de amostras fecais líquidas colocar:

- a) 0,9 mL da solução tampão Tris/HCl 0,01M com 0,0015M de CaCl₂ pH 7.2 a 0,1mL da amostra a microtubos estéreis de 2,0 mL previamente identificados.
- b) As etapas seguintes são as mesmas para amostras sólidas.

Em caso de amostras de fezes coletadas em fralda ou em gaze

- a) Cortar com o auxílio de uma pinça e tesoura estéreis um pedaço da fralda ou gaze de 3X3 e colocar no tubo contendo o Tris/HCl 0,01M com 0,0015M de CaCl₂ pH 7.2;
- b) As etapas seguintes são as mesmas para amostras sólidas.

OBS1: A fim de evitar contaminação as suspensões fecais deverão ser preparadas de três em três com intervalos de 10 minutos, tendo-se o cuidado de esterilizar novamente a cabine de fluxo laminar e trocar as luvas.

OBS2: Não esquecer de fazer uma tabela para anotar a quantidade de tempo em minutos do uso da luz ultravioleta.

OBS3: Excepcionalmente, em caso de amostras cuja quantidade de fezes seja muito inferior diminuir proporcionalmente o preparo da suspensão fecal.

OBS4: Preparar a suspensão fecal na quantidade suficiente para ser usada a fim de evitar a degradação da partícula viral.

4.6 – PREPARO DE REAGENTES

- a) Solução de Tris/HCl/Ca⁺⁺0,01 pH 7,2

Tris- hidroximetil-tris-aminometano	1,21 g
Cloreto de Cálcio	0,22 g
Água destilada q.s.p.	1000mL


Pesar os reagentes. Homogeneizar o Tris com aproximadamente 800 mL de água destilada até dissolver totalmente o soluto e depois adicionar o Cloreto de Cálcio. Ajustar o pH com ácido clorídrico PA e depois completar o volume para 1000mL. Aliquotar e autoclavar a 121°C por 20 minutos. Conservar a 4°C.

OBS1: Esta solução é válida por seis meses após a data de fabricação.

CONTROLE DE REGISTROS

Identificação	Coleta	Indexação	Acesso	Arquivamento	Armazenamento	Manutenção	Disposição
Ficha de trabalho GAL	Atendimento (Triagem LACEN)	Nº do registro da amostra.	Analistas e técnicos	Laboratório de Virologia	Prateleira em pastas registrador	1 ano no laboratório e 4 no arquivo morto.	Lixeira de resíduo comum.
Protocolo de ensaio	Laboratório de Virologia	Nº do registro da amostra.	Analistas e técnicos	Laboratório de Virologia	Prateleira em pastas suspensas	1 ano no laboratório e 4 no arquivo morto.	Lixeira de resíduo comum.

APÊNDICE – H – POP DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR) PARA DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		POP	3.04.02.90
			Revisão:	0
			Folha:	104 / 4
Título:	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR) PARA DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS			
Revisão: 0	Data: 01/02/2016	Motivo: Primeira emissão		

Elaborado por:	Júlia Pantoja Marques Farmacêutica-Bioquímica	Aprovado por:	Edcelha Soares D'Athaide Ribeiro Chefe do Laboratório de Virologia
----------------	--	---------------	---

Referências: PGP 3.04.00.01 Recebimento, análise e processamento de amostras biológicas.

Gentsch et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., 1992: v.30,nº 6, p. 1365-1373.

Gouvêa et al. Polimerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. J. Clin. Microbiol., 1990; v. 28, nº2, p. 276-282.

Leite et al. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: Characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. Arch. Virol., 1996, v. 141, nº12, p. 2365-2374.

Iturriza-Gómara et al. Comparasion of specific and random priming in the reverse transcriptase polymerase chain reaction for genotyping group a rotaviruses. J. Virological Methods 78 (1999) 93-103.

Executante da tarefa:

- g) Profissional de nível superior responsável pelo Rotavírus: supervisão, controle de qualidade, e interpretação dos resultados.
- h) Profissionais de nível superior treinados: execução da RT-PCR e emissão de resultado dos exames realizados no LACEN/Ap

Hora/freqüência de execução: 07:00h às 13:00h e 14:00h às 18:00h. De segunda a sexta feira.

Local de execução: Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Virologia.

Resultado esperado: Validação do ensaio e o laudo liberado em tempo hábil.

Equipamentos:

- Geladeira a 4°C;
- Freezer -20°C ou -70°C;
 - Micro “spin”;
 - Câmara asséptica para PCR;
 - Termociclador;
 - Agitador de tubos orbitais

Materiais necessários:

- EPIs (jaleco, luvas, máscara, propé, gorro e óculos);
- Microtubos de 200µL, 500µL e 1,7µL;
- Estante para microtubos;
- Caneta para microtubos;
- Recipiente contendo gelo;
- Micropipeta e ponteiras descartáveis de 10, 50, 200, 1000µL;
- Hipoclorito de sódio a 5%;
- Gaze;
- Abridor de microtubos;
- Cooler

Cuidados especiais:

- Utilizar equipamentos de proteção individual: luvas, jaleco, máscara, gorro e óculos de proteção.
- As micropipetas devem ser limpas com etanol 70%.
- O procedimento deve ser realizado em cabine de fluxo laminar classe A2,
- Antes e após o procedimento a cabine de fluxo laminar deve ser limpa com hipoclorito a 2,5% e esterilizada por ação da luz UV durante 10 minutos.

Documentos complementares: Protocolo de identificação das amostras para RT-PCR.

Passos / Atividades:

17. OBJETIVO

Detecção do ácido nucléico viral de rotavírus pela técnica da reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) utilizando primers específicos em espécimes fecais de seres humanos.

18. CAMPO DE APLICAÇÃO

Diagnóstico de infecção por rotavírus a partir de espécime fecal proveniente de seres humanos após a extração dos dsRNA viral.

19. TERMINOLOGIA / SIGLAS E DEFINIÇÕES

- p) dsRNA: ácido ribonucléico viral de fita dupla;
- q) cDNA: DNA complementar;
- r) pb: pares de base;
- s) primers ou iniciadores: pequena seqüência de RNA com ate 20 nucleotídeos;
- t) Beg9(+)/End9(-): “primers” para amplificar uma região de 1062pb do gene VP7;
- u) 4con3(+)/4con2(-): “primers”para amplificar uma região de 875pb do gene VP4;
- v) μ L: microlitro;
- w) nm: nanomoles;
- x) μ M: micromolar;
- y) $^{\circ}$ C: graus Celsius;
- z) EPI: equipamento de proteção individual;
- aa) RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa;
- bb) TBE: tampão Tris-borato-EDTA;
- cc) MQ: milli-Q;
- dd) dNTPs: desoxiribonucleotídeos;

20. PROCEDIMENTO

20.1 FUNDAMENTO DO MÉTODO

A reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) é um método utilizado para amplificação de ácidos nucléicos. Através da enzima Transcriptase Reversa (RT), o genoma viral dos rotavírus será transcrito e produzirá uma fita de DNA complementar (cDNA). Dois pequenos fragmentos de RNA (primers) complementares às extremidades de uma sequencia particular de interesse poderão ser amplificados usando a enzima Taq DNA Polimerase, e deste modo obter cópias da região de DNA que se pretende amplificar.

20.2 - DESCRIÇÃO DOS INICIADORES (“ PRIMERS”)

Uma mistura de 1µL de primers para o tipo G de rotavírus humano (Beg9 e End9) ou para o tipo P (4con3 e 4con2), 20µM de cada primer são usados de acordo com o descrito na tabela 1 visando amplificar fragmentos de 1062pb, 875pb, respectivamente, para os genes VP7 e VP4 de rotavírus humano.

Quadro 1 Seqüências dos primers utilizados na RT-PCR para caracterização molecular dos tipos G e P de rotavírus.

Primer	Seqüência	Gene	Tamanho	
			amplicon	Referência
			(pb)*	
Beg 9 (-)	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G	VP7	-	Gouvea,1990
End 9 (+)	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG	VP7	1062	Gouvea,1990
4con 3 (+)	TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A	VP4	-	Gentsch, 1992
4con 2 (-)	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	VP4	875	Gentsch, 1992

20.3 - SALA DA MIX (SALA LIMPA)

- i) Esterilizar a sala de preparo da mistura por meio de luz UV por 10 minutos.
- j) Identificar os microtubos a serem usados na reação.
- k) Com o jaleco de transporte, pegar gelo picado na sala de esterilização, colocar no recipiente de transporte e transferir este gelo para o recipiente da sala de mix.
- l) Retirar todos os reagentes necessários do freezer -70°C e transportá-lo até a sala de mix.
- m) Descongelar os reagentes e colocá-los no gelo.
- n) Em um microtubo estéril preparar a mistura da reação para o cDNA e para a RT-PCR de acordo com os reagentes constantes na tabela 2.
- o) Transferir os microtubos para o recipiente de transporte com gelo e levar para a sala de extração.

Quadro 2 Reagentes necessários para realização da RT-PCR

REAGENTES	RT Por reação em μL	TAQ Por reação em μL
Produto da extração*	2 a 5	-
dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) 2,5mM	1	1
Tampão 10X sem Mg	2,5	2,5
MgCl ₂ 50mM	1	1
SuperScript II – RT 20 U/ μL	0,25	-
Taq DNA polimerase 5 U/ μL	-	0,25
Água DNase/RNase free q.s.p.	25	25

*Será adicionado na sala de extração

4.7 – SALA DE EXTRAÇÃO

- u) Esterilizar a câmara de PCR com luz UV por 10 minutos.
- v) Transferir os microtubos para o recipiente da sala de extração.
- w) Adicionar 2 μL do produto extraído nos microtubos.
- x) Centrifugar os tubos a 13.000rpm por 20 segundos.
- y) Levar os microtubos para o termociclador e deixá-los a uma temperatura de 97°C por 5 minutos.
- z) Transferir as amostras para um isopor com gelo por 5 minutos para dar o choque térmico.
- aa) Na câmara de PCR estéril adicionar a cada tubo 22 μL da mistura para a obtenção do cDNA (RT).
- bb) Colocar os tubos no termociclador por 1 hora a 42°C e 97°C por 10 minutos para a obtenção cDNA.
- cc) Após a obtenção do cDNA, adicionar a cada tubo 24 μL da mistura da segunda mix (PCR).
- dd) Colocar os tubos no termociclador no programa RT-PCR para a amplificação sob as seguintes condições:

97°C por 2 minutos	Desnaturação inicial:
94°C por 30 segundos	
50°C por 30 segundos	35 ciclos
72°C por 1 minuto	
72°C por 10 minutos	1 ciclo
4°C por 1 hora	

ee) Armazenar os produtos da RT-PCR em freezer -20°C e posteriormente analisá-los em gel de agarose a 1,5%.

OBS1: O pool de primers irá depender do gene a ser testado como descrito a seguir:

3. Gene VP7 para o tipo G de rotavírus (origem humana): iniciadores Beg9(+)/End9(-);
4. Gene VP4 para o tipo P de rotavírus (origem humana): iniciadores 4con3(+)/4con2(-);

– PREPARO DE REAGENTES

- ✓ Reidratação de iniciadores ou primers liofilizados (sala limpa);
- 7. Fazer o cálculo para a reidratação do iniciador com base na quantidade de nanomoles contida no frasco de forma a deixá-lo na concentração de 200µL. Exemplo de reidratação do prime 4con3 liofilizado com base na concentração de 59,4 nanomoles: $59,4/200 \times 100 = 297\mu\text{L}$.
- 8. Centrifugar o iniciador liofilizado por 1 minuto a 13.000 rpm de forma a retirar qualquer resíduo da parede ou tampa do frasco;
- 9. Reidratar com 297µL de água livre de DNase/RNase.
- 10. Agitar em agitador de tubos e deixar no gelo ou geladeira durante 15 minutos;
- 11. Rotular os tubos onde irão ficar os primers diluídos com data e concentração;
- 12. Aliquotar aproximadamente 50µL e estocar os mesmos a -70°C.
 - ✓ Diluição dos DNTPs
 - 4. Os 4 DNTPs estão na concentração de 100mM cada;
 - 5. Diluir os DNTPs para a concentração final de 2,5mM adicionando 9mL de água livre de DNase/RNase e 250µL de cada DNTP, totalizando 10mL;
 - 6. Fazer alíquotas do DNTP 2,5mM e estocá-los a -70C;

OBS.: Todos esses reagentes deverão ser diluídos na sala limpa, onde é estritamente proibida a entrada, devido a possíveis contaminantes.

CONTROLE DE REGISTROS

Identificação	Coleta	Indexação	Acesso	Arquivamento	Armazenamento	Manutenção	Disposição
Ficha de trabalho GAL	Atendimento (Triagem LACEN)	Nº do registro da amostra.	Analistas e técnicos	Laboratório de Virologia	Prateleira em pastas registrador	1 ano no laboratório e 4 no arquivo morto.	Lixeira de resíduo comum.
Protocolo de ensaio	Laboratório de Virologia	Nº do registro da amostra.	Analistas e técnicos	Laboratório de Virologia	Prateleira em pastas suspensas	1 ano no laboratório e 4 no arquivo morto.	Lixeira de resíduo comum.

APÊNDICE – I – POP DE REALIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DO GENOMA VIRAL DO ROTAVÍRUS

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		POP	3.04.02.91
			Revisão:	0
			Folha:	111 / 4

Título: **REALIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DO GENOMA VIRAL DO ROTAVÍRUS**

Revisão: 0 Data: 01/02/2016 Motivo: Primeira emissão

Elaborado por: Júlia Pantoja Marques Farmacêutica-Bioquímica	Aprovado por: Edcelha Soares D'Athaíde Ribeiro Chefe do Laboratório de Virologia
---	---

Referências: PGP 3.04.00.01 Recebimento, análise e processamento de amostras biológicas.

BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, M.M.M. et al. Rapid and simple method for purifications of nucleic acids. **J.Clin. Microbiol.**, 28: 495-503, 1990.

Executante da tarefa: Analista laboratorial de nível superior e nível médio do Serviço de Virologia responsável pelo diagnóstico de Rotavírus.

Hora/frequência de execução: 07:00h às 13:00h De segunda a sexta feira.

Local de execução: Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Virologia.

Resultado esperado: Validação do ensaio e o laudo liberado em tempo hábil.

Equipamentos:

- Geladeira a 4°C,
- Freezer -20°C ou -70°C,
- Cabine de fluxo laminar tipo 2,
- Microcentrifuga,
- Balança analítica para pesagem dos reagentes,
- Agitador de tubos orbital,
- Vortex,
- Banho maria

Materiais necessários:

- EPIs (jaleco, luvas, máscara, gorro e óculos),
- Micropipetas de 1000 e 100µL,
- Microtubos de 500 e 1500µL,
- Estantes para microtubos,
- Relógio digital,
- Abridor de microtubos
- Papel absorvente,
- Micro ponteiras estéreis,
- Hipoclorito de Sódio 2% (preparar na hora) para

descarte de reagentes e ponteiros.

- Caixas para estoque de micro tubos.
- Recipiente para descarte de material contaminado.

Cuidados especiais:

- Utilizar equipamentos de proteção individual: luvas, jaleco, máscara, gorro e óculos de proteção.
- As micropipetas devem ser limpas com etanol 70%,
- O procedimento deve ser realizado em cabine de fluxo laminar classe A2,
- Antes e após o procedimento a cabine de fluxo laminar deve ser limpa com hipoclorito a 2,5% e esterilizada por ação da luz UV durante 10 minutos.

Documentos

Protocolo de armazenamento do produto de extração.

complementares:

Passos / Atividades:

21. OBJETIVO

Realização da extração do genoma viral do rotavírus.

22. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplicam-se as suspensões fecais para utilização envolvendo métodos moleculares para detecção e caracterização de rotavírus.

23. TERMINOLOGIA / SIGLAS E DEFINIÇÕES

- m) Sedimentos: componentes da solução que ficaram no fundo do tubo após a centrifugação.
- n) Sobrenadante: solução acima do sedimento.
- o) μL : microlitro.
- p) r.p.m.: rotação por minuto.
- q) q.s.p.: quantidade suficiente para.
- r) EPIs: equipamento de proteção individual.
- s) UV: ultravioleta.
- t) TA: temperatura ambiente.
- u) POP: Procedimento Operacional Padrão.
- v) P.A.: para análise.
- w) $^{\circ}\text{C}$: grau Celsius.
- x) mL : mililitro.
- y) N: normal.

4 PROCEDIMENTO

4.1 FUNDAMENTO DO MÉTODO

Sob ação de isotiocianato de guanidina (Tampões L2 e L6) as proteínas celulares e virais são destruídas expondo o ácido nucleico que se une (via pontes de hidrogênio) à sílica. Após sucessivas lavagens o acido nucléico será eluído e conservado a -20°C .

4.2 AMOSTRAS

a) Suspensões fecais

4.3 Reagentes

- Tampão L2
- Tampão L6
- Solução de Dióxido de sílica
- Proteinase K
- Etanol absoluto
- Etanol a 70%
- Acetona
- Hidróxido de sódio (NaOH) 10N
- Água livre de DNase/RNase
- Solução de hipoclorito de sódio 5%

4.8 - Técnica

ff) Pipetar em um tubo de 1,5mL, previamente identificado, 300µL de suspensão fecal.

OBS.: Para o controle negativo será utilizado água livre de DNase/RNase e para os controles positivos serão utilizadas amostras sabidamente dos genótipos G1,G2,G9 e G12.

gg) Adicionar 20µL de proteinase K (20mg/mL) e 800µL de Tampão L6. Agitar em vortex por 10 segundos.

hh) Incubar em banho Maria a 56°C por 10 minutos.

ii) Adicionar 200µL de Etanol Absoluto (96%) (gelado) e 20µL de sílica e agitar em vortex por 10 segundos.

jj) Homogeneizar em agitador orbital por 20 minutos a TA.

kk) Centrifugar a 14.000 rpm por 40 segundos.

ll) Descartar o sobrenadante em frasco contendo NaOH 10N.

mm) Adicionar 500µL de Tampão L2.

nn) Homogeneizar em vortex e centrifugar a 14.000 rpm por 30 segundos.

oo) Descartar o sobrenadante em frasco contendo NaOH 10N.

pp) Adicionar 500µL de Etanol 70% (gelado).

qq) Homogeneizar em vortex e centrifugar a 14.000 rpm por 40 segundos.

rr) Descartar o sobrenadante em frasco contendo hipoclorito de sódio a 5%.

ss) Adicionar 500µL de Acetona PA (gelada).

- tt) Homogeneizar em vortex e centrifugar a 14.000 rpm por 40 segundos.
- uu) Descartar o sobrenadante em frasco contendo hipoclorito de sódio 5%.
- vv) Secar o sedimento em banho-maria 56°C por 15 minutos (os tubos devem ficar com a tampa aberta e o banho-maria sem tampa).
- ww) Adicionar 60µL de água livre de DNase/RNase free e homogeneizar em vortex por 10 segundos.
- xx) Incubar em banho-maria a 56°C por 15 minutos (os tubos devem ficar fechados assim como o banho-maria).
- yy) Homogeneizar em vortex e centrifugar a 14.000 rpm por 30 segundos.
- zz) Centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos.
- aaa) Coletar cuidadosamente o sobrenadante (30 a 40µL) e transferir para um microtubo de 500µL previamente identificado.
- bbb) Armazenar o produto da extração à -20°C.

4.9 – PREPARO DE REAGENTES

a) Tampão L6

Isotiocianato de guanidina	120 g
Tris-HCl 0,1M, Ph 6,4	100 mL
Triton X - 100	1,3 g
EDTA 0,2 M, Ph 8,0	22 mL

Em recipiente de vidro colocar EDTA 0,2 M, pH 8,0, juntamente com Tris-HCl 0,1M, pH 6,4. Adicionar o isotiocianato de guanidina e homogeneizar até total dissolução. Por ultimo, acrescentar triton X-100 lentamente. Armazenar em frascos de cor âmbar e estocar a TA.

b) Tampão L2

Isotiocianato de guanidina	120 g
Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4	100mL

Homogeneizar o isotiocianato de guanidina juntamente com tris-HCl 0,1 M, Ph 6,4 até dissolver totalmente o soluto. Armazenar em frascos de cor âmbar e estocar a TA.

c) Sílica

Dióxido de sílica	60 g
Água destilada q.s.p.	500mL

Homogeneizar a sílica e deixar sedimentar por 24h. Aspirar por sucção 430 mL e desprezar o sobrenadante. Completar o volume para 500 mL com água destilada, homogeneizar, sedimentando-se naturalmente por 5h. Aspirar, por sucção, 440 mL do sobrenadante e desprezá-lo. Ajustar o sedimento para pH 2,0 pela adição de 600µL de ácido clorídrico PA. Aliquotar 10 mL da solução em frascos de cor âmbar, autoclavar e estocar a TA.

d) Etanol 70%

Etanol PA	70 mL
Água destilada q.s.p.	100mL

Em uma proveta adicionar 70 mL de Etanol PA e completar com água destilada até o volume final de 100 mL.

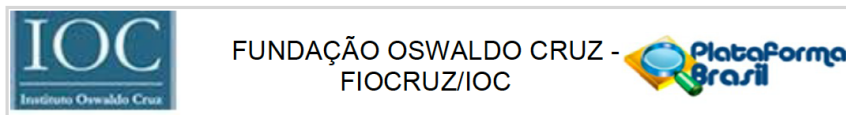
OBS1: Os reagentes são válidos por 6 meses após a data de fabricação

CONTROLE DE REGISTROS

Identificação	Coleta	Indexação	Acesso	Arquivamento	Armazenamento	Manutenção	Disposição
Ficha de trabalho GAL	Atendimento (Triagem LACEN)	Nº do registro da amostra.	Analistas e técnicos	Laboratório de Virologia	Prateleira em pastas registrador	1 ano no laboratório e 4 no arquivo morto.	Lixeira de resíduo comum.
Protocolo de ensaio	Laboratório de Virologia	Nº do registro da amostra.	Analistas e técnicos	Laboratório de Virologia	Prateleira em pastas suspensas	1 ano no laboratório e 4 no arquivo morto.	Lixeira de resíduo comum.

ANEXO

ANEXO-A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR PARA A DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE ROTAVÍRUS A CIRCULANTES EM CRIANÇAS NO AMAPÁ EM APOIO A VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

Pesquisador: Sílvia Maria Lopes Bricio

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 34806314.0.0000.5248

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Patrocinador Principal: LABORATORIO CENTRAL DE SAUDE PUBLICA - LACEN

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 922.408

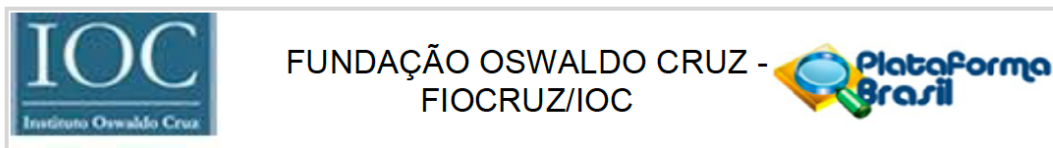
Data da Relatoria: 14/10/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo de dissertação de mestrado em Vigilância Sanitária do INCQS estudo é do tipo descritivo, transversal e integrante de uma investigação epidemiológica e molecular que abrange o Hospital da Criança, a Unidade de Pronto Atendimento Infantil (PAI) e a pediatria de um hospital particular a ser desenvolvido no LACEN/Amapá.

Perante as dificuldades do Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá (LACEN-AP) para elucidar os casos suspeitos de diarreia aguda por rotavírus devido ao não preenchimento da ficha epidemiológica do paciente e consequentemente, a não colheita do espécime fecal e portanto, ausência de dados sobre os genótipos de rotavírus circulantes no Estado. Neste contexto, a oferta e implantação de métodos diagnósticos para doenças diarreicas ocasionadas por RV no estado do Amapá, propiciará o fortalecimento da vigilância em saúde do rotavírus em crianças de 0 a 5 anos no município de Macapá, Amapá. O estudo envolverá aproximadamente 100 amostras fecais de crianças com até cinco anos de idade com gastroenterite aguda. Grupo controle de casos assintomáticos será constituído a partir de amostras colhidas de crianças sem diarreia, na proporção de uma amostra para três casos investigados (n=30). Os espécimes fecais serão colhidos no Hospital da Criança, a Unidade de Pronto Atendimento Infantil (PAI) e na pediatria de um hospital particular, cujo estudo no LACEN-AP será realizado o teste Ensaio imunoenzimático

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 922.408

para detecção de antígeno de rotavírus A (ELISA) e posteriormente analisado no Laboratório de Virologia do Instituto Evandro Chagas (IEC PA), que atua como laboratório de referência, onde serão realizados os testes moleculares para identificação genética do RV.

Objetivo da Pesquisa:

O estudo busca fortalecer o serviço de vigilância em saúde para doenças diarreicas ocasionadas por RV em crianças de 0 a 5 anos no município de Macapá, Amapá, através da Implantação de metodologias para caracterização dos grupos, eletroferotipos e genotipagem dos tipos G e P de rotavírus no LACEN, Amapá; determinação da frequência, distribuição etária e temporal das infecções causadas por rotavírus em crianças com e sem diarreia aguda; e comparação dos genótipos circulantes com o estado vacinal e o quadro clínico apresentado pelos menores.

Os objetivos parecem válidos e avaliáveis pelas técnicas e métodos explicitados

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios potenciais são avaliados no projeto e trazidos nos TCLE. Em geral, os riscos trazidos são apenas dados por possível perda do sigilo, e os benefícios pelo diagnóstico precoce e tratamento adequado da rotavirose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto suficientemente claro, bem fundamentado, sem necessidade de ser encaminhado para a CONEP. O estudo proposto parece pertinente e possui valor científico. A Metodologia é adequada e permitirá atingir os objetivos, no entanto não foi trazido o cálculo do tamanho amostral o que impede avaliar se o número de 130 amostras será suficiente para conferir a validade externa dos resultados proposta.

Não foram evidenciados aspectos em não conformidade com a Resolução 466/12 e norma operacional do CNS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados e avaliados os seguintes documentos:

Folha de rosto: assinada pelo pesquisador responsável, pelo responsável pela instituição proponente (INCQS) e o patrocinador responsável (LACEN). Ausentes as instituições colaboradoras: Instituto Evandro Chagas, SVS, MS, Pará; Hospital da Criança e adolescente, Hospital São Camilo e

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 922.408

São Luis.

Projeto: no formato Plataforma e na íntegra

TCLE para responsável de menor e para sujeito de pesquisa: com endereço do CEP do IOC/Fiocruz e da instituição local. Conforme à resolução 466/12 do CNS.

Questionários, instrumento de coleta dos dados: apresentada ficha clínica-epidemiológica que inclui dados pessoais completos dos casos.

Termos de Anuência e de Compromisso de pesquisadores envolvidos e instituições colaboradoras: chefia do LACEN/AP, Declaração de coordenação de execução do projeto pela mestrandia farmacêutica Julia P Marques do LACEN/AP, termo de adesão e de compromisso da orientadora Joana D`Arc Pereira Mascarenhas, do Laboratório de Virologia, Instituto Evandro Chagas, Pará, Termos de anuência de instituições onde serão obtidas as amostras: Laboratório de Análises Clínicas do Hospital da Criança e do adolescente e Unidade de Pronto Atendimento Infantil (PAI), e Hospital São Camilo e São Luis, Macapá. Cronograma e orçamentos apresentados conformes.

Curriculae vitae da pesquisadora principal e da orientanda apresentados, confirma-se a capacidade técnica dos envolvidos.

Recomendações:

Foram trazidos critérios de não inclusão como critérios de exclusão. Lembrando que critérios de exclusão são os critérios de eliminação dos casos já incluídos, como por exemplo, casos graves que impeçam a coleta das fezes pelo responsável.

Os programas estatísticos não são adequados para o gerenciamento dos dados, recomenda-se uso de programas específicos para bancos de dados, tais como epiinfo (CDC, Atlanta, EUA).

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

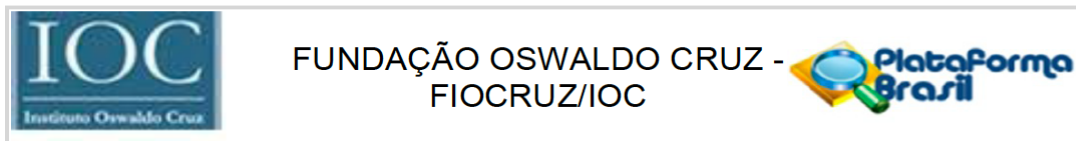
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

No conjunto parece adequado metodologicamente, e é considerado eticamente aceitável.

O TCLE tem em linguagem acessível à compreensão dos sujeitos da pesquisa e conforme à Res. 466/12 e foi esclarecido que será aplicado antes da coleta das amostras. Lembramos que devem ser assinadas duas vias de igual teor.

Retirar os dados pessoais dos participantes da ficha clínica-epidemiológica para favorecer a manutenção da confidencialidade dos dados.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 922.408

Visto que o cronograma indica que a coleta de amostras teria início em Outubro de 2014, é preciso que os pesquisadores garantam que a pesquisa não teve início. Caso tenha sido iniciada o parecer deste CEP não terá validade.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), em sua 200a Reunião Ordinária, realizada em 15.12.2014, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 18 de Dezembro de 2014

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br