



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA

NÚCLEO DE SAÚDE

MESTRADO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

MARIA DO SOCORRO CALIXTO DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DO MÉTODO OGAWA-KUDOH E COMPARAÇÃO COM O MÉTODO
LOWENSTEIN-JENSEN PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE NO ESTADO
DE RONDÔNIA**

PORTO VELHO

2008

MARIA DO SOCORRO CALIXTO DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DO MÉTODO OGAWA-KUDOH E COMPARAÇÃO COM O MÉTODO
LOWENSTEIN-JENSEN PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE NO ESTADO
DE RONDÔNIA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação – Mestrado em Biologia Experimental do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia/UNIR, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Experimental. Área de Concentração: Patógeno/hospedeiro.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Manuela da F. Moura
Co-orientadora: Ms. Cleoni Alves Mendes de Lima

PORTO VELHO
2008

Catálogo Biblioteca Central / UNIR

O482c

Oliveira, Maria do Socorro Calixto de

Análise do Método Ogawa-Kudoh e Comparação com o Método Lowenstein-Jensen para Diagnóstico da Tuberculose no Estado de Rondônia/ Maria do Socorro Calixto de Oliveira . Orientadoras Maria Manuela da F. Moura e Cleoni Alves Mendes de Lima. – Porto Velho, 2008.

61f.

Dissertação apresentada à Fundação Universidade Federal de Rondônia para obtenção do título de Mestre em Biologia Experimental

1.Microbiologia 2. Tuberculose I. Título

CDU : 579(811.1)

MARIA DO SOCORRO CALIXTO DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DO MÉTODO OGAWA-KUDOH E COMPARAÇÃO COM O MÉTODO
LOWENSTEIN-JENSEN PARA DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE NO ESTADO
DE RONDÔNIA**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação – Mestrado em Biologia
Experimental do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia/UNIR, como
requisito para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Experimental.**

Julgada em: 11 de Março de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Maria Manuela da Fonseca Moura, Presidente
Universidade Federal de Rondônia

Prof.^a Dr.^a. Juliana Pavan Zuliani
Instituto de Pesquisa e Patologia Tropical

Dr. Adalberto Rezende Santos, Membro Externo
Fundação Oswaldo Cruz

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, pelo amor, carinho e estímulo,
dedico-lhes esta conquista como gratidão.**

AGRADECIMENTOS

A Deus por andar sempre ao meu lado, por me encher de bênção de dia e noite e por me carregar no colo quando o fardo parece pesado demais.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Maria Manuela da Fonseca Moura, pela oportunidade e confiança.

A Ms. Cleoni Alves Mendes de Lima, mais do que co-orientadora, uma amiga, sempre presente, solícita e disposta a somar com seus conhecimentos. Obrigada pelo seu apoio constante, carinho e orientação.

Àos meus amigos Denise, Edilene, Jefferson, Quéssia sempre presentes.

Aos meus irmãos, Valney, Vanuza, Vanúbia, Vanderley e Sônia Honora e a minha linda sobrinha Ana Laura pelo o amor e confiança que sempre tiveram em mim.

Ao meu namorado Juscelino, obrigada pelo carinho e incentivo ao longo destes dois anos.

Ao Laboratório Central de Rondônia - LACEN na pessoa de Lourdes Maciel por permitir que a pesquisa fosse realizada nesta Instituição.

E aos demais colegas contribuidores, Daniele, Nancy, Acilon, Wilson e principalmente a Luzinete e Ray, todos do LACEN-RO.

A profissional do CEMETRON: Enf^ª Helena Dias, pela colaboração.

A Coordenadora do Programa de Tuberculose: Analice Alves Pereira.

Aos colegas do Laboratório de Genética - Centro Interdepartamental de Biologia Experimental e Biotecnologia/CIBEBI: Adriana, Fábio, Glauber, Maria Helena, Roger.

Ao Dr. Adalberto Rezende Santos e o Dr. Philip Noel Suffys FIOCRUZ/RJ, pois sempre tiveram disposto a contribuir na minha caminhada científica.

Como são grandes as riquezas de Deus! Como são profundos o seu conhecimento e a sua sabedoria! Quem pode explicar as suas decisões? Quem pode entender os seus planos? Como dizem as Escrituras Sagradas:

“Quem pode conhecer a mente do Senhor?

Quem é capaz de lhe dar conselhos?

Quem já deu alguma coisa a Deus,
para receber dele algum pagamento?”

Pois todas as coisas foram criadas por Ele, e tudo existe por meio dele e para Ele. Glória a Deus para sempre! Amém!

Rm 11:33

RESUMO

A tuberculose é uma doença infecciosa crônica que acompanha a humanidade desde os primórdios da História. Hoje, ela se apresenta como um dos problemas que mais preocupa as autoridades sanitárias de todo o mundo, devido à sua crescente incidência em diferentes grupos populacionais. Entre os países com maior número de casos de tuberculose, o Brasil ocupa o 15º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo. A incidência nacional de casos é de 50/100.000 habitantes. Em Rondônia, em 2006 foram registrados 454 casos novos de tuberculose com incidência de 46/100.000. O Programa Nacional de Controle da Tuberculose prioriza a cultura para os casos de baciloscopia negativa com suspeita clínica, tuberculose extrapulmonares e HIV positivos. Este estudo comparou o método de descontaminação e cultura Ogawa-Kudoh com o método de descontaminação Lauril Sulfato de Sódio com sementeira em Lowenstein Jensen. Foram analisadas 80 amostras de culturas, para diagnóstico e controle de tratamento de pacientes. Verificou-se que nas 25 amostras com culturas positivas, 23 (92%) cresceram pelo método Ogawa-Kudoh e 10 (40%) cresceram pelo método Lauril Sulfato de Sódio com sementeira em Lowenstein Jensen. Observou-se um alto índice de contaminação 11,2% na técnica Lauril Sulfato de Sódio-Lowenstein Jensen, já na técnica Ogawa-Kudoh o índice foi de 5%. Comparando a baciloscopia com a cultura nos dois métodos, das 19 amostras com baciloscopias positivas, 16 (84,21%) culturas foram positivas no meio Ogawa-Kudoh e 6 (31,57%) positivas no Lauril Sulfato de Sódio-Lowenstein Jensen; 2 (10,53%) culturas foram negativas no meio Ogawa-Kudoh e 5 (26,31%) negativas para o método Lauril Sulfato de Sódio-Lowenstein Jensen. Nas amostras paucibacilares, o método Ogawa-Kudoh apresentou maior sensibilidade, 7 (11,47%) enquanto no Lauril Sulfato de Sódio-Lowenstein Jensen 4 (6,56%). O sexo masculino prevaleceu com 67,53%, quanto à faixa etária predominaram os indivíduos a partir dos 40 anos com 66,65% dos casos. Os resultados obtidos neste experimento reforçam que o método simplificado Ogawa-Kudoh pode substituir o método Lauril Sulfato de Sódio-Lowenstein Jensen sem prejuízos para a busca de casos no Programa Nacional de Controle da Tuberculose em nosso Estado, principalmente em laboratórios com baixos recursos financeiros e tecnológicos.

Palavra chaves: Tuberculose, Diagnóstico, Descontaminação, cultura, Ogawa-Kudoh, Lauril Sulfato de Sódio, Lowenstein-Jensen.

ABSTRACT

Tuberculosis is a chronic infectious disease that follows the humanity since the very first beginning of the history. Today, it is presented like one of the problems that worries the sanitary authorities throughout the world, due to its increasing incidence in different groups of populations. Among the countries with a great number of tuberculosis cases, Brazil ranks the 15^o place among 22 countries responsible for 50% of the total of tuberculosis cases in the world. The national incidence of cases 50/100.000 inhabitants. In Rondônia in 2006 were registered 454 new cases of tuberculosis with of incidence of 45/100.000. The Control Tuberculosis Program prioritizes the culture for negative bacilloscopy cases with clinic suspect; TB extrapulmonary and positive HIV's. This study compares the method of decontamination and Ogawa-Kudoh culture as a decontamination method Sodium Lauril Sulfate with Lowenstein Jensen sowing. 80 samples of cultures were analyzed for diagnosis and for control of treatment of patients. It was verified that in 25 samples with positive cultures, 23 (92%) increased in Ogawa-Kudoh method and 10 (40%) increase in Sodium Lauril Sulfate with Lowenstein Jensen sowing. the obtained results concerning the contamination, it was observed a high rate in Sodium Lauril Sulfate-Lowenstein Jensen 11,2%, whereas in Ogawa-Kudoh method the rate of contamination was in 5%. Compared the smears with the culture in both methods, from 19 samples with positive smears, 16 (84,21%) cultures were positive in the Ogawa-Kudoh method and 6 (31,57%) positive in Sodium Lauril Sulfate-Lowenstein Jensen; 2 (10,53%) cultures were negatives in the Ogawa-Kudoh method and 5 (26,31%) negative for Sodium Lauril Sulfate-Lowenstein Jensen. In sample considered paucibacilars, the Ogawa-Kudoh method showed more sensibility 7 (11,47%) whereas Sodium Lauril Sulfate-Lowenstein Jensen 4 (6,56%) they were analyzed concerning sex, age group, the male sex prevailed with 67,53%, concerning the age group 40 years-old of individuals were prominent with 66,65% of cases. The obtained results in this experiment reinforce the idea of the Ogawa-Kudoh simplified method could substitute the Sodium Lauril Sulfate-Lowenstein Jensen without damage in the search of cases in Control of Tuberculosis National Program in our State, especially in laboratories with low financial and technologic resources.

Key words: Tuberculosis, Diagnostic, decontamination, culture, Ogawa-Kudoh, Sodium Lauril Sulfate, Lowenstein-Jensen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição espacial da tuberculose no mundo, segundo coeficiente de incidência/100.000 habitantes, 2005.....	16
Figura 2 – Descontaminação NaOH 4%.....	31
Figura 3 – Comparação entre o tempo de crescimento das culturas, em dias, nos métodos KOK e LSSLJ.....	39
Figura 4 – Semeadura com <i>swab</i> no meio Ogawa-Kudoh.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Comparação entre resultados positivos, negativos e contaminados de culturas executadas pela técnica KOK e LSSLJ.....	35
Tabela 2 - Resultado da cultura utilizando KOK e LSSLJ segundo baciloscopia.....	40
Tabela 3-Distribuição dos participantes do estudo segundo o sexo e grupo etário.....	42
Tabela 4- Procedência das amostras.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR-Bacilos Álcool-Ácido Resistentes

E - Especificidade

FT- Fosfato Trissódico

LJ-Lowenstein-Jensen

LSS-Lauril Sulfato de Sódio

LSSLJ-Lauril Sulfato de Sódio-Lowenstein Jensen

MGIT-Tubo Indicador de Crescimento Micobacteriano

OMS-Organização Mundial de Saúde

OK-Ogawa Kudoh

PLJ-Petroff-Lowenstein Jensen

S-Sensibilidade

TB-Tuberculose

VPP+-Valor Preditivo Positivo

VPN- -Valor Preditivo Negativo

SINAN-Sistema Nacional de Agravos e Notificação

HIV-Vírus da Imunodeficiência Humana

PPD-Purified Protein Derivative (Derivado Protéico Purificado – Tuberculina)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	15
1.2 ETIOLOGIA E TRANSMISSÃO DA DOENÇA.....	17
1.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA DOENÇA.....	20
1.4 DIAGNÓSTICO.....	20
1.4.1 Clínico.....	20
1.4.2 Radiológico.....	21
1.4.3 Broncoscopia.....	21
1.4.4 Teste tuberculínico.....	21
1.4.5 Anátomo Patológico.....	22
1.4.6 Bioquímico.....	22
1.4.7 Sorológico	22
1.4.8 Baciloscopia.....	23
1.4.9 Amplificação dos Ácidos Nucléicos.....	23
1.4.10 Cultura.....	24
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3. JUSTIFICATIVA.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 PERÍODO E LOCAL DO ESTUDO.....	30
4.2 BIOSSEGURANÇA.....	30
4.3 AMOSTRAS.....	30
4.4 PROCEDIMENTOS ÉTICOS.....	30
4.5 COLETA DE DADOS.....	31
4.6 PROCESSAMENTOS DE AMOSTRAS.....	31
4.6.1 Baciloscopia.....	31
4.6.2 Método de descontaminação Ogawa-Kudoh.....	31
4.6.3 Método de descontaminação Lauril Sulfato de Sódio.....	32
4.7 SEMEADURA	32
4.7.1 Meio Ogawa Kudoh (pH 6,4).....	32
4.7.2 Löwenstein-Jensen.....	32
4.8 LEITURA DE DADOS	33
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÕES	44
RECOMENDAÇÕES.....	45

REFERÊNCIAS.....	46
ANEXOS.....	52

INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Epidemiológicos

A tuberculose é uma doença infecciosa crônica que acompanha a espécie humana desde os primórdios da História. Hoje, ela se apresenta como um dos problemas que mais preocupa as autoridades sanitárias de todo o mundo, devido à sua crescente incidência em diferentes grupos populacionais (BARATA 1999; FIUZA, 1996).

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), um terço da população mundial está infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* que, a cada ano, infecta 8 milhões de pessoas, dos quais 2,9 milhões vão a óbito. Dos 8 milhões de casos anuais, 95% ocorrem em países em desenvolvimento. A tuberculose é um problema social resultante de vários elementos intervenientes como renda familiar baixa, educação precária, habitação ruim/inexistente, famílias numerosas, adensamentos comunitários, desnutrição, alcoolismo, doenças infecciosas associadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002-a; ROUQUAYROL et al., 1999).

Figuram, ainda, como corolários do aumento da morbimortalidade da tuberculose, a deterioração do serviço público de saúde, a falha na distribuição das drogas antituberculosas a falta de pessoal treinado para o diagnóstico, a notificação dos casos diagnosticados e o acompanhamento do paciente com tuberculose ativa (ALVES et al., 2000).

Diversos estudos comprovam que as dificuldades para controlar a tuberculose aumentaram com o advento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), por meio da co-infecção *M. tuberculosis*/HIV, tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento (MASCARENHAS et al., 2005).

Considerando a dimensão do problema, a OMS declarou a tuberculose como uma emergência global em 1993 e apontou 22 países em desenvolvimento como responsáveis por 80% da carga mundial da doença (WHO, 2005) (Figura 1).

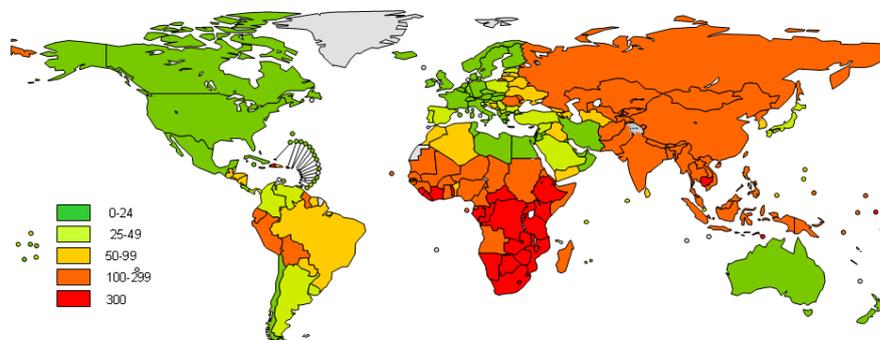


Figura 1: Distribuição da tuberculose no Mundo, segundo coeficiente de incidência / 100.000 habitantes, 2005.

Fonte: OMS (WHO, 2006)

Entre os países com maior número de casos de tuberculose, o Brasil ocupa o 15º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo. Estima-se uma prevalência de 50 milhões de infectados com cerca de 111.000 casos novos e 6.000 óbitos ocorrendo anualmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007-a).

Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/MS), são notificados anualmente 85 mil casos novos (correspondendo a um coeficiente de incidência de 47/ 100.000 habitantes) no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007-a).

As metas internacionais estabelecidas pela OMS e pactuadas pelo governo brasileiro são de descobrir 70% dos casos de tuberculose estimados e curá-los em 85% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007-a).

O problema da tuberculose no Brasil reflete o estágio de desenvolvimento social do país, onde os determinantes do estado de pobreza, a fragilidade na organização do sistema de saúde e as deficiências de gestão limitam a ação da tecnologia e, por consequência, inibem a queda sustentada das doenças marcadas pelo contexto social. No caso da tuberculose, duas novas causas concorrem para o agravamento do quadro: i) a epidemia de AIDS e ii) a multirresistência às drogas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002-b).

Aproximadamente, 80% dos pacientes com tuberculose estão em idade economicamente produtiva de 15-49 anos o que representa um sério impacto no País, tanto social quanto economicamente (KUBY, 2002).

No levantamento sobre a situação da tuberculose no Brasil realizado por Ruffino-Netto, (2002), Rondônia apresentou coeficiente de incidência para a doença de 43/100.000 em 1999. Segundo esse estudo, o Estado encontrava-se numa situação favorável, um pouco abaixo da média nacional. No entanto, Escobar et al., (2001) revisaram os registros disponíveis da doença notificados em Rondônia, no período de 1992-1998 e encontraram a presença de 5.600 casos de tuberculose, resultando numa prevalência de aproximadamente 64,4/100.000 e o coeficiente de mortalidade específico de 3,2 óbitos / 100.000hab.

Segundo a Secretaria Estadual de Saúde, em 2005 foram registrados 545 casos novos de tuberculose com incidência de 35,5/100.000hab. A coorte de tratamento, considerando os casos diagnosticados em 2005 nos municípios prioritários, mostrou cura de 68,1%. O abandono foi de 7,5%; com 3,3% de óbitos de pacientes, e transferência de 16,0% e um percentual de casos sem informação de 5,1% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007-b). Em 2006 foram notificados 546 casos de tuberculose, destes 454 foram casos novos, 373 casos na forma pulmonar, sendo 249 casos bacilíferos com uma incidência de casos novos de 46/100.000hab.

O Ministério da Saúde realizou um levantamento que indicou 315 municípios como responsáveis por 70% da carga da doença no país. Estes municípios foram considerados como prioritários para que as ações de controle da tuberculose fossem intensificadas(HIJAR, 2005). No Estado de Rondônia os municípios considerados prioritários são: Ariquemes, Cacoal, Guajará-Mirim e Porto Velho (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004-a).

1.2 Etiologia e Transmissão da doença

O termo “tuberculose” foi possivelmente utilizado pela primeira vez por Shönlein em 1839 (GRANGE, 1996). Esta denominação, tornou obsoletos os termos “Tísica” ou “Consumção”, antes utilizados em alusão à exuberante caquexia característica dos estágios mais avançados desta enfermidade. Um dos mais significativos e completos estudos sobre a tuberculose foi realizado pelo cientista alemão Robert Koch. Em 1882, Koch apresentou à comunidade científica o isolamento e forma de cultivo, a partir de tubérculos macerados, identificando o agente etiológico da doença *Mycobacterium tuberculosis*, e que ficou mais

conhecido como bacilo de Koch. Por sua contribuição científica, Koch recebeu o prêmio Nobel de Medicina em 1905. O bacilo da tuberculose, juntamente com o bacilo de Hansen *Mycobacterium Leprae* descoberto alguns anos antes, foram as primeiras espécies incluídas no gênero *Mycobacterium*, descrito, taxonomicamente, por Lehmann e Neumann em 1896 (LEHMANN; NEUMMAN, 1896 apud RIBEIRO, 2006, p. 17)

O gênero *Mycobacterium* contém grande número de espécies, sendo que várias delas sempre foram reconhecidas como espécies, mas outras só os foram recentemente. Todas as espécies do gênero caracterizam-se por serem bacilos finos, retos ou ligeiramente encurvados, com aproximadamente 0,3 a 0,6 x 0,5 a 4,0 μm (PELCZAR, 1981). Dificilmente podem ser corados pelo método de Gram, mas são considerados como Gram positivos pelas características da sua parede celular. São álcool-ácido resistentes e, quando coradas a quente com fucsina fenicada de Ziehl ou a frio com auramina, retêm os corantes após lavagens com soluções de álcool e ácido (propriedade utilizada na coloração de Ziehl-Neelsen) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002-c). Sua parede é constituída principalmente por ácidos micólicos, formando uma barreira hidrofóbica que confere resistência à dessecação, à descoloração por álcool e ácido e a diversos agentes químicos e antibióticos. O bacilo da tuberculose é aeróbio estrito, necessitando de oxigênio para crescer e se multiplicar. Por ser capaz de sobreviver e de se multiplicar no interior de células fagocitárias, é considerado um parasito intracelular facultativo. Seu tempo de geração é longo podendo variar de 14 a 20 horas em temperaturas próximas a 37° C. É, de modo geral, sensível à ação de agentes físicos como o calor e a radiação ultravioleta (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002-).

Runyon, (1959) classificou as micobactérias em quatro grupos de acordo com a taxa de crescimento, produção de pigmento e característica morfológica. Posteriormente, devido a diferentes características morfológicas e fenotípicas, como também por razões operacionais, certas espécies foram agrupadas e definidas como “complexos”. Entre eles tem-se o “complexo tuberculosis” que inclui as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. Canett*, *M. caprae* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). O *M. tuberculosis* é a principal bactéria deste complexo por ser patogênica para o homem. Casos de tuberculose humana devido a *M. africanum* e *M. canetti* foram reportados, principalmente na África (SOOLINGEN, 1997).

O *M. bovis*, agente etiológico de tuberculose bovina, também pode infectar o homem e outros animais. Estudos na Argentina e Inglaterra reportaram que esta espécie é responsável por 0,4% a 1% dos casos de tuberculose humana (YATES 1988; BARRERA,1997). No Brasil não existem estimativas da proporção de pacientes com tuberculose causada pelo *M. bovis*, no

entanto é importante que o sistema de saúde esteja atento à possibilidade de ocorrência deste agente. Em alguns locais, ele assume o papel de principal agente etiológico causador da doença, apresentando-se de forma idêntica ao *M. tuberculosis*, mas com maior incidência da forma ganglionar e outras extrapulmonares. Sua ocorrência é mais freqüente em comunidades que consomem leite e produtos derivados (não pasteurizados ou fervidos) de rebanho bovino infectado, em pacientes provenientes de áreas rurais e em profissionais (veterinários, ordenhadores, funcionários de matadouros, entre outros) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005-a)

Os indivíduos portadores de tuberculose pulmonar são classificados como bacíferos e não-bacíferos. Os indivíduos bacíferos são assim denominados por eliminarem uma quantidade superior a 5.000 ml/ bacilos por escarro, o que permite a detecção deste microorganismo pela baciloscopia. Os indivíduos denominados não bacíferos, ou paucibacilares, eliminam menores quantidades de bacilos no escarro, resultando na não detecção dos mesmos pela baciloscopia. É importante ressaltar ainda, que alguns estudos relatam a existência de uma correlação positiva entre a quantidade de bacilos eliminados e a extensão da doença (KIM et al.,1984; CÓ et al., 2004).

A principal fonte de infecção humana é o indivíduo portador da tuberculose pulmonar bacilífera, ou seja, aquele que elimina bacilos no escarro. Ao falar ou tossir esse indivíduo lança no ar gotículas contaminadas de tamanhos variados que podem ser inaladas por seus contactantes. Apenas as gotículas com diâmetro de 2 a 10 μm e poucos bacilos (1 ou 2) conseguem alcançar os bronquíolos e alvéolos e iniciar sua multiplicação. As gotículas maiores são depositadas no trajeto bifurcado da árvore traqueobrônquica e eliminadas pelo mecanismo de defesa mucociliar, sendo deglutidas, inativadas pelo suco gástrico e eliminados nas fezes (TARANTINO; LEITÃO DE OLIVEIRA, 1990).

A infecção pelo bacilo da tuberculose pode ocorrer em qualquer idade, mas no Brasil geralmente acontece na infância. Nem todas as pessoas expostas ao bacilo da tuberculose se tornam infectadas. A infecção por tuberculose, sem doença, significa que os bacilos estão presentes no organismo, mas o sistema imune está mantendo-os sob controle. Entre os infectados, a probabilidade de apresentar a doença aumenta na presença de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e outras formas de imunodepressão, na presença de desnutrição, silicose, diabetes e em usuários de drogas endovenosas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005-a). Dentre esses, cerca da metade vai adoecer nos cinco primeiros anos seguintes à primo infecção, casos esses denominados tuberculose primária. O restante adoecerá após os cinco anos, e são os casos de tuberculose pós - primária. Os casos de

tuberculose secundária podem ocorrer devido aos bacilos da primo-infecção que permanecem em estado de latência, mas que posteriormente se tornam ativos e começam a se multiplicar, produzindo a doença por meio da reativação endógena ou uma nova infecção - reinfeção exógena, que pode ocorrer desde os cinco anos após a primo infecção até o final da vida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004-b).

1.3 Características Gerais da Doença

A tuberculose é uma síndrome infecciosa de curso crônico, que acomete com maior frequência os pulmões, e apresenta como principais sinais e sintomas: tosse, expectoração por mais de 3 semanas, febre baixa e emagrecimento. O quadro clínico da tuberculose pulmonar pode incluir ainda outras manifestações respiratórias como dispnéia, dor torácica e hemoptise. Esta doença também pode comprometer sítios extrapulmonares. Nesse caso, os principais sítios de implantação são aqueles com maior suprimento sanguíneo e, portanto, de oxigênio, como o córtex renal, o córtex cerebral, as extremidades de crescimento dos ossos longos, as vértebras e adrenais. Na tuberculose disseminada ou miliar, ocorre o comprometimento extensivo dos pulmões, fígado e medula óssea (FIUZA DE MELO; AFIUNE, 1993).

1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da tuberculose tem como base um conjunto de evidências clínicas, epidemiológicas e sociais, seguido da confirmação bacteriológica obtida através de exames complementares. Os exames utilizados na investigação diagnóstica da tuberculose podem ser presuntivos ou confirmatórios. Do primeiro grupo fazem parte os exames radiográficos, bioquímicos, citológicos, histopatológicos e imunológicos, incluindo as sorologias. O segundo grupo consiste dos exames bacteriológicos (baciloscopia e cultura), que detectam a bactéria ou componentes de sua estrutura, e dos testes moleculares, que detectam seqüências específicas de ácidos nucleicos por intermédio de técnicas de biologia molecular (RIBEIRO, 2006).

1.4.1 Clínico

O diagnóstico da tuberculose é realizado através da anamnese e do exame físico do paciente. A história familiar, informações sociais, doenças anteriores e a história de contato prévio com pacientes portadores da doença, constituem dados importantes, que conduzem à formulação de hipóteses acerca do diagnóstico. É recomendado que o diagnóstico clínico seja

confirmado com o auxílio de exames complementares, contudo, alguns pacientes podem ser diagnosticados com base apenas na forte suspeita clínica e resposta ao tratamento anti-TB, mesmo na ausência da confirmação bacteriológica (CHAN et al., 2000).

1.4.2 Radiológico

A evolução da tuberculose é acompanhada de anormalidades radiográficas na maioria dos casos. Por isso, a radiografia do tórax é importante auxiliar no diagnóstico, justificando-se sua utilização, quando possível, nos casos suspeitos. É sempre importante realizar o exame radiológico para um diagnóstico correto. Este exame permite a identificação de pessoas portadoras de imagens sugestivas de tuberculose devendo ser consideradas duas situações distintas: a tuberculose primária e a tuberculose secundária – que se manifestam clínica e radiologicamente de forma distinta. O exame radiológico, em pacientes com baciloscopia positiva, tem como função principal a exclusão de outra doença pulmonar associada, que necessite de tratamento concomitante, além de permitir avaliação da evolução radiológica dos pacientes, sobretudo daqueles que não responderam à quimioterapia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005-a).

1.4.3 Broncoscopia

A broncoscopia e os procedimentos a ela associados, a exemplo de lavado brônquico, lavado broncoalveolar, escovado brônquico, biópsia brônquica, biópsia transbrônquica e punção aspirativa com agulha podem ser úteis no diagnóstico da tuberculose nas seguintes situações: formas negativas à baciloscopia, suspeita de outra doença pulmonar que não a tuberculose, presença de doença que acomete difusamente o parênquima pulmonar, suspeita de tuberculose endobrônquica ou em pacientes imunodeprimidos, particularmente os infectados pelo HIV (MINISTERIO DA SAÚDE, 2005-a).

1.4.4 Teste tuberculínico

Indicada como método auxiliar no diagnóstico da tuberculose, a prova tuberculínica positiva, isoladamente, indica apenas infecção e não é suficiente para o diagnóstico da tuberculose doença (SILVA JR., 2004).

No Brasil, a tuberculina usada é o PPD RT23, aplicada por via intradérmica no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo, na dose de 0,1ml, equivalente a 2 UT (unidades de tuberculina) (SILVA JR, 2004).

A técnica de aplicação e o material utilizado são padronizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e têm especificações semelhantes às usadas para a vacinação BCG. A leitura da prova tuberculínica é realizada 72 a 96 horas após a aplicação, medindo-se, com régua milimetrada, o maior diâmetro transverso da área de endurecimento palpável. O resultado, registrado em milímetros, classifica-se como:

- **0mm a 4mm** – não reator – indivíduo não infectado pelo *M. tuberculosis* ou com hipersensibilidade reduzida.
- **5mm a 9mm** – reator fraco – indivíduo vacinado com BCG ou infectado pelo *M. tuberculosis* ou por outras micobactérias.
- **10mm ou mais** – reator forte – indivíduo infectado pelo *M. tuberculosis*, que pode estar doente ou não, e indivíduos vacinados com BCG nos últimos dois anos.

1.4.5 Anátomo-patológico (histológico e citológico)

Sempre que possível, deve-se realizar a biópsia nas formas extrapulmonares. No material colhido será feito o exame direto, a cultura e o exame anátomo-patológico, para identificar *M. tuberculosis* ou o processo inflamatório granulomatoso compatível com a tuberculose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005-a).

1.4.6 Bioquímico

São mais utilizados em casos de tuberculose extrapulmonar, principalmente no derrame pleural, derrame pericárdico e meningoencefalite tuberculosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005-a).

1.4.7 Sorológico

São métodos diagnóstico recentes, de custo elevado e valores preditivos variáveis, muitos ainda não definitivamente testados ou aprovados. Apesar das perspectivas futuras quanto à sua utilidade no diagnóstico precoce, não são recomendados para a rotina diagnóstica de tuberculose no Brasil, ficando seu uso restrito a alguns centros de referência e

pesquisa onde podem ser utilizados para casos que demandem diagnóstico rápido (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005-a).

1.4.8 Baciloscopia

Nos países em desenvolvimento, a baciloscopia, ou exame direto do escarro, é o método diagnóstico mais empregado no serviço de saúde em função de sua simplicidade, rapidez e baixo custo. Os métodos de colorações específicas para micobactérias são o de Ziehl-Neelsen, o mais convencional, permitindo a identificação do bacilo álcool-ácido-resistente (BAAR), e a técnica do fluorocromo, usando-se auramina-rodamina (HAUNA, 1996).

A baciloscopia tem algumas limitações, dentre os quais podemos citar o grande número de bacilos necessários para a positividade do teste. O exame só costuma ser positivo em amostras com uma concentração mínima de 5.000 bacilos por mililitro de secreção o que limita sua sensibilidade. Outro inconveniente é o fato de o resultado apenas identificar o microorganismo como BAAR, visto ser incapaz de diferenciar espécies de micobactérias, o que pode influenciar na sua especificidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994; AFIUNE et al 1993).

1.4.9 Amplificação dos Ácidos nucleicos

Este método diagnóstico vem sendo utilizado, com o objetivo de se acelerar a confirmação etiológica. Entre eles podemos citar a reação em cadeia da polimerase (PCR), o qual amplifica e detecta o RNA ribossomal do *M.tuberculosis* ou ainda amplifica e detecta o DNA deste mesmo agente etiológico (KRISTKI; CONDE; SOUZA, 2000). Apesar de apresentarem, elevadas sensibilidade e especificidade (95% a 98%) em amostras com baciloscopia positiva, o seu rendimento diagnóstico é inferior com baciloscopia negativa, nas quais a sensibilidade varia de 48-53% (FRIEDEN et al., 2003). Portanto, a interpretação dos resultados obtidos por estas técnicas deve ser feita de forma cuidadosa, sendo importante destacar que sua utilização não se aplica em caso controle de tratamento, nem tampouco substitui a realização da cultura (RIBEIRO et al., 2004).

1.4.10 Cultura

A cultura é o método bacteriológico mais acurado disponível até ao momento para o diagnóstico da tuberculose pulmonar e extrapulmonar. Enquanto o diagnóstico da forma pulmonar pela baciloscopia requer 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro de escarro, o diagnóstico através da cultura pode ser realizado a partir de 10 bacilos por mililitro de escarro. A cultura possibilita dessa forma, diagnosticar mais precocemente os casos novos de tuberculose pulmonar, nos quais a eliminação bacilar não é suficiente para ser detectada pela baciloscopia, evitando o aparecimento dos bacilíferos que são a fonte de transmissão da doença. Além disso, o cultivo permite posterior identificação da micobactéria isolada, assim como a realização do teste de sensibilidade, o que não é possível quando se realiza somente a baciloscopia.

A sensibilidade da cultura varia de 80% a 100% e a especificidade de 96% a 100% (BERGER et al., 1973). Além de estar indicada para o diagnóstico das formas paucibacilares da tuberculose pulmonar, deverá ser usada também rotineiramente em todas as formas extrapulmonares, para o diagnóstico das micobacterioses e nos serviços que recebam material para o diagnóstico de pacientes co-infectados com o vírus HIV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005-b).

Apesar de todo investimento nestes últimos anos, em novos métodos diagnóstico e o avanço alcançado em metodologias que tragam mais agilidade ao diagnóstico da tuberculose, a cultura continua seguindo como padrão ouro. As modernas metodologias baseadas em biologia molecular são complexas e de alto custo, inviabilizando sua utilização de forma universalizada (PEDRO et al., 2001).

1.4.10.1 Descontaminação das amostras

As amostras como escarro, lavado, aspirado, urina, material de cavidade podem estar contaminadas por apresentar flora microbiana associada. Espécimes contaminados devem ser tratados com finalidade de eliminar os microrganismos contaminantes, que, por se desenvolverem mais rapidamente que as micobactérias, impedem a multiplicação destas. Esse tratamento é feito com agentes químicos aos quais as micobactérias são conhecidamente mais resistentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005-b).

Diversos métodos são usados para minimizar a contaminação da cultura, quando os espécimes são retirados dos locais não-estéreis do corpo e são processadas. A maioria destes

métodos inclui a digestão do muco ou de restos orgânicos e o tratamento para eliminar microorganismos da flora normal. Ambas as etapas são executadas para maximizar a probabilidade de isolar a micobactéria na cultura. Nenhum método de descontaminação é aplicável a todas circunstâncias e espécimes clínicos; conseqüentemente, um laboratório deve usar o melhor método que mantém a taxa de contaminação entre 3 % e 5%. Uma taxa de contaminação abaixo de 3 % pode indicar que o procedimento usado é demasiadamente agressivo e pode matar as micobactérias (PALOMINO et al., 2007).

Os métodos de descontaminação mais usados são:

- Hidróxido de sódio- este método usa o hidróxido de sódio nas concentrações que variam entre 2 % e 4 % para digerir e, ao mesmo tempo, descontaminar o espécime. Cada laboratório deve determinar a concentração mais baixa para digestão e descontaminação ideal (PALOMINO et al., 2007).

- N-acetil cisteína-Hidróxido de sódio. Este método, um dos mais usados em todo mundo, usa o N-acetilcisteína para a digestão do muco e hidróxido de sódio como descontaminante (PALOMINO et al., 2007).

- Ácido oxálico - método recomendado para a descontaminação dos espécimes clínicos que podem ter aeruginosa como um contaminador, geralmente espécimes da urina e espécimes pulmonares de pseudomonas em pacientes com fibrose cística (PALOMINO et al., 2007).

- Ogawa-Kudoh - método muito simples e prático de descontaminação que não utiliza centrifugação do espécime antes de cultivar. O procedimento foi descrito por Kudoh usando o hidróxido de sódio para digestão-descontaminação e inoculação em meios modificados de Ogawa (KUDOH, 1974). Não requer recursos tecnológicos do laboratório e pode ser executado em locais de difícil acesso (PALOMINO et al., 2007).

- Lauril sulfato de sódio - este método é recomendado para o tratamento de espécimes paucibacilares, por utilizar uma concentração mais baixa de hidróxido de sódio (1%) que a utilizada em outros métodos e, um agente tensoativo que facilita a homogeneização dos espécimes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005-b).

- Petroff – Este método utiliza hidróxido sódio, destrói grande porcentagem de micobactérias, mas não é recomendado para espécimes paucibacilares (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994).

- Método de Corper & Stoner, modificado (Fosfato Trissódico) - Este método é utilizado para tratamento de espécimes paucibacilares pois a atuação do fosfato trissódico é menor,

quando comparado com outros métodos. Além disso, pode ser utilizado para transporte de escarro, se não exceder 24 horas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994).

1.4.10.2 Meio de cultura

Existem diferentes tipos de meios de culturas disponíveis para o cultivo das micobactérias. O mais utilizado no Brasil é o de Löwenstein-Jensen, um meio sólido à base de ovo; porém, o meio de Ogawa-Kudoh, também à base de ovo, vem sendo utilizado por alguns laboratórios em sua rotina (RIBEIRO, 2006). Outros meio de cultura à base de ágar, tais como o Middlebroock 7H10 e 7H11, além dos meio líquidos, como o 7H9 e 7H12, também podem ser utilizados para cultivo destes microorganismos. Dentre os meios sólidos, o crescimento de colônias nos meio à base de ovo é mais lento, porém, melhor do que o observado para os meios a base de ágar. Por estas razões a cultura em meio sólido, é o método mais utilizado no diagnóstico da tuberculose. Entretanto, é necessário um período de 2 a 8 semanas para que se observe o crescimento de colônias de *M.tuberculosis* neste meio (FURIN; JOHNSON, 2005).

Existem, ainda, métodos automatizados, como o BATEC 960 *System*, um sistema de detecção radiométrico que utiliza o meio líquido Middlebrook 7H9 acrescido de ácido palmítico marcado com radioisótopo do carbono [^{14}C]. Este método possui a grande desvantagem de utilizar material radioativo. O sistema automatizado que mede consumo de oxigênio (SA- O₂) BACTEC-960[®] -MGIT[™] utiliza o mesmo meio de cultura, mas com sensor fluorescente que reage à concentração de oxigênio do meio de cultura (ALMEIDA, et al., 2005). Métodos de cultura semi-automatizados e automatizados são mais sensíveis que os tradicionais (MITCHISON, 2005) e possibilitam um diagnóstico precoce, com detecção de 7-21 dias (MORGAN et al., 1983). No entanto, o custo elevado não permite a utilização dos mesmos pela grande maioria dos serviços de saúde (RIBEIRO, 2006).

O meio de Ogawa-Kudoh, que tem composição semelhante ao Löwenstein-Jensen, não contém asparagina, apresenta um pH baixo (6,4) e obtêm-se por ajuste na composição dos tampões (fosfato de monopotássico, citrato de magnésio e glutamato de sódio), uma vez que é indicado quando a descontaminação da amostra é realizada pelo método de Ogawa-Kudoh (KUDOH e KUDOH, 1974). Sendo mais econômico porque substitui a asparagina pelo glutamato de sódio, um aminoácido de fácil disponibilidade e preço acessível. Contém também concentrações elevadas do verde de malaquita para inibir a contaminação com outras bactérias. Esta combinação é muito apropriada para cultivar espécimes de escarros em locais

de difícil acesso (PALOMINO et al.,2007). Por ser um meio à base de ovo oferece várias vantagens: é de fácil preparação, apresenta baixo custo em relação aos demais meios disponíveis, suporta um bom crescimento de bacilos da tuberculose, pode ser armazenado no refrigerador por diversas semanas. Possui menor probabilidade de contaminar por ser coagulado depois de distribuído nos tubos. A maioria das micobactérias cresce bem neste meio (WHO, 1998).

O método de descontaminação e meio de cultura utilizado em nosso Estado é o Lauril Sulfato de Sódio e Lowenstein-Jensen, respectivamente. Estes métodos são recomendados pelo Ministério da Saúde, e são realizados no Laboratório Central de Rondônia-LACEN-RO. A maioria dos municípios do Estado de Rondônia, realizam a baciloscopia, portanto é necessário a utilização da cultura para o diagnóstico ou acompanhamento de casos. As amostras são enviadas para o LACEN/RO em Porto Velho, único órgão responsável pela cultura em todo Estado. Algumas amostras são mal acondicionadas, chegando em condições inadequadas para a realização do exame e proporcionando atraso, ou mesmo inviabilizando seu diagnóstico.

No estudo realizado por Ribeiro FH. et al., (2006) foram encontradas diferenças significativas na taxa de contaminação dos métodos (O-K = 1,9%, LSS = 22,4% e FT = 16,7%). Estes dados mostram que o método de Ogawa-Kudoh (O-K) apresenta uma eficiência de isolamento de micobactérias semelhante aos métodos de Lauril Sulfato de Sódio e Fosfato Trissódico e menor índice de contaminação e que, portanto poderia ser utilizado de uma forma mais ampla em nosso país.

Segundo Takao et al., (2005), a sensibilidade, praticidade de realização do método Ogawa-Kudoh, segurança para o manipulador, bem como a formulação simples do meio e menor custo, devido a não incorporação de asparagina (KUDOH e KUDOH, 1974) permite considerar o método Ogawa-Kudoh como um excelente recurso para cultura de BAAR em laboratórios com pequeno suporte financeiro e de recursos humanos, fato que ocorre na maioria dos municípios de Rondônia. Seria assim uma alternativa às técnicas relacionadas ao diagnóstico da tuberculose de acordo com a realidade local.

Este trabalho se propôs estudar o método de descontaminação e cultura Ogawa-Kudoh por ser um método simples, sensível e de baixo custo e, tem também como alvo sugerir implantação em vários municípios do Estado, principalmente nos municípios prioritários e ou de difícil acesso, trazendo como grande vantagem a melhoria na qualidade do diagnóstico bacteriológico da tuberculose, favorecendo a busca de casos e propiciando ainda estudos de

sensibilidade/resistência a drogas e identificação de micobactérias não tuberculosas, aumentando a cobertura diagnóstica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a eficácia e viabilidade de utilização, para diagnóstico bacteriológico da tuberculose, da técnica de descontaminação de amostra descrita por Kudoh & Kudoh e semeadas em meio de Ogawa modificado, comparado com a técnica de descontaminação de Lauril Sulfato de Sódio e semeadura em meio de cultura de Lowenstein-Jensen.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e padronizar o método de Ogawa-Kudoh;
- Avaliar a efetividade do método Kudoh e Kudoh para descontaminação em relação ao método do Lauril Sulfato de Sódio;
- Comparar a positividade da baciloscopia em relação à cultura pelo método de Ogawa-Kudoh *versus* método do Lauril Sulfato de Sódio- Lowestein Jansen;
- Divulgar os resultados obtidos para possível implantação da técnica no estado de Rondônia.

3 JUSTIFICATIVA

A técnica de cultura para isolamento do *Mycobacterium tuberculosis* é muito importante por ser altamente sensível e fornece valiosas informações da virulência, identificação, sensibilidade ou resistência às drogas e outras propriedades biológicas do bacilo da tuberculose.

O método de descontaminação e cultura mais extensivamente usado é o de Lauril Sulfato de Sódio e Lowenstein-Jensen, o qual requer técnicas mais demoradas, aparelhos bem mais sofisticados, expõe mais o técnico que está manuseando e há perigo de ser contaminado. Além disso, este método é difícil de ser aplicado em laboratórios de recursos escassos.

O cultivo de micobactérias pelo método de Ogawa-Kudoh (KOK) utiliza um procedimento de descontaminação e semeadura simples e rápidos não necessitando de equipamentos, vidrarias e pessoal especializado para sua realização (SUSEMIHL et al., 1993). A manipulação reduzida da amostra e a não utilização de mecanismo de agitação/centrifugação, favorece a execução da técnica em laboratórios de menor complexidade, reduzindo a produção de aerossóis e, conseqüentemente, a contaminação ambiental e do pessoal do laboratório (COELHO et al., 1999).

O estudo compativo das duas técnicas de descontaminação e cultura Ogawa-Kudoh e Lauril Sulfato de Sódio-Lowenstein-Jensen, contribuirá para divulgação científica do método Ogawa-Kudoh e implementação do diagnóstico da tuberculose em Rondônia. Além que, aprendizagem da técnica e o fato de estar sendo desenvolvido no LACEN-RO, pode assim, auxiliar na instalação deste método no Estado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Período e Local do Estudo

As amostras foram coletadas no período de maio a novembro de 2007. O recebimento das amostras, o exame baciloscópico e a cultura foram realizados no Laboratório Central de Saúde Pública de Rondônia-LACEN/RO. Foi desenvolvido para esta pesquisa o método Ogawa-Kudoh. O método Lauril Sulfato de Sódio com semeadura em Lowenstein-Jensen é desenvolvido como rotina pelo LACEN-RO.

4.2 Biossegurança

Para manipulação das amostras foi utilizada uma câmara de classe II, também referida como, cabine de segurança biológica, na qual o ar circula no interior da mesma, passando por um filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air). Para descontaminação da superfície e do ar ambiente é utilizada lâmpada ultravioleta (250 nm). Os equipamentos de segurança individual consistem de avental, máscaras N95 e luvas. O material contaminado foi colocado em recipientes adequados e esterilizado através de autoclave, antes de ser lavado ou desprezado. Como desinfetantes foram utilizados: fenol a 5%, hipoclorito de sódio na concentração de 1%, formaldeído de 3 a 8%, glutaraldeído a 2% e álcool 70°.

4.3 Amostras

Para o estudo comparativo entre as técnicas de descontaminação e cultura foram processadas 80 amostras (73 de origem pulmonar e 7 de origem extrapulmonar), desta 56 (70%) encaminhadas para diagnóstico e 24 (30%) para controle de tratamento. As amostras são provenientes de pacientes de todo estado, cedidas pelo LACEN-RO (ANEXO A).

4.4 Procedimentos Éticos

Para realização do presente trabalho, o projeto foi previamente submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Rondônia (ANEXO B).

4.5 Coleta de Dados

Os dados das variáveis independentes, sexo, idade, baciloscopia, e procedência da amostra foram retirados da requisição de exames de cultura.

4.6 Processamento das Amostras

4.6.1 Baciloscopia

Para a pesquisa de Bacilos Álcool Ácido-Resistentes (BAAR) foram feitos esfregaços de cada amostra de escarro e corados utilizando o método de Ziehl-Neelsen. Foram realizadas leitura das lâminas e quantificação bacilar segundo a escala semiquantitativa. Para a confirmação dos resultados negativos é observada toda a extensão da lâmina (MINISTÉRIO DA SAÚDE-SVS, 2005-b).

4.6.2 Método de descontaminação de Ogawa-Kudoh

Este método é também conhecido como “*New swab culture method*”, (KUDOH e KUDOH, 1974). Utilizou-se Hidróxido de Sódio a 4% como agente de descontaminação (Anexo C). Um *swab* estéril, após ser impregnado com o escarro, foi deixado por 2 minutos em NaOH 4% (Figura 2) e então semeado com movimentos rotatórios e em zigue-zague, no meio de Ogawa modificado (Ogawa-Kudoh) com pH ácido de 6,4, o que dispensa a neutralização, pois o meio é tamponado (SUSEMIHL, et al., 1993; COELHO, et al., 1999).

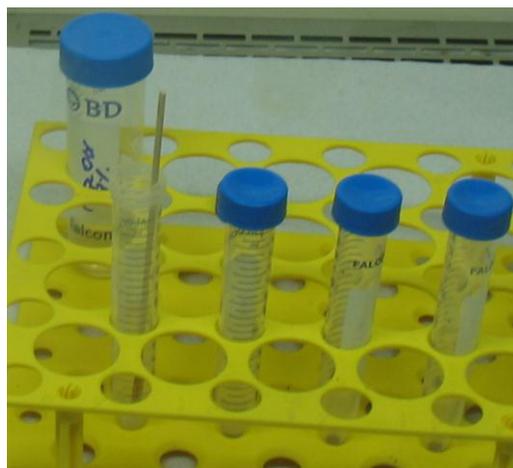


Figura 2 – Descontaminação NaOH 4%

4.6.3 Método de descontaminação Lauril Sulfato de Sódio

Antes de tratar o material, calculou-se previamente o volume da Solução B (ANEXO D) necessário para neutralizar a solução A (ANEXO D). Assim que as soluções foram preparadas, autoclavadas e resfriadas juntou-se 3 ml de cada uma delas e mediu-se o pH. A partir daí fizeram-se correções contínuas, aumentando o volume da solução B, até chegar ao pH 7,0, calculando-se quanto B neutraliza 2ml, 3ml, 4ml e 5ml da solução A. Em seguida foram adicionados 3ml da Solução “A” a aproximadamente 2ml do espécime analisado contido em tubo de centrífuga, com capacidade para 50ml. No caso de escarro muito purulento foi adicionado um volume maior da Solução “A” (3,5ml a 4,0ml), a fim de fluidificar o espécime. O volume de 2 ml do espécime foi obtido a partir da parte mais purulenta. Agitou-se periodicamente por 30 minutos. Depois juntou-se a Solução “B” em volume suficiente para neutralizar a solução “A”. Em seguida a mistura foi centrifugado, a 3.000g durante 30 minutos, para concentração dos bacilos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005-b).

Este método foi realizado por técnicos do LACEN-RO.

4.7 Semeadura

4.7.1 Meio Ogawa-Kudoh (pH 6,4)

Após a descontaminação da amostra o *swab* impregnado com escarro foi inoculado no tubo contendo meio de cultura (ANEXO F). Em seguida incubou-se em estufa a

37° C com a rolha frouxa. Após 48 horas, se ocorreu a evaporação do líquido semeado, a rolha é apertada. Cada amostra foi semeada em dois tubos.

As leituras foram realizadas semanalmente e anotados os respectivos resultados (ANEXO E). As culturas positivas eram retiradas da estufa e enviadas para identificação e teste de sensibilidade do LACEN/DF-Brasília. Após 60 dias, foram consideradas negativas as culturas que não apresentaram crescimento.

4.7.2 Löwenstein-Jensen

Após a etapa da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado em recipiente à prova de respingos, todo o sedimento foi semeado em volumes de 0,1 ml por tubo de meio de cultura (Anexo G). Incubou-se em estufa a 37° C com a rolha frouxa. Após 48 horas, se ocorreu à evaporação do líquido semeado a rolha foi apertada. Cada amostra foi semeada em dois tubos.

As leituras realizadas semanalmente foram registradas (ANEXO E). As culturas positivas eram retiradas da estufa e enviadas para identificação e teste de sensibilidade, LACEN/DF-Brasília. Após 60 dias, foram consideradas negativas as culturas que não apresentaram crescimento.

4.8 Leitura dos Dados

Os tubos de culturas dos métodos Ogawa-Kudoh e Lowenstein-Jensen foram examinados nas primeiras 48 horas para a verificação da secagem e quanto à presença de contaminação. As leituras das colônias foram realizadas duas vezes durante as duas primeiras semanas, sendo que (a segunda leitura da primeira semana foi feita sempre após sete dias exatos, (já que é um parâmetro importante para a identificação posterior) e depois uma vez por semana até completar 8 semanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004-c).

4.9 Análise Estatística

Para estimar o grau de concordância entre as técnicas de cultura de Ogawa-Kudoh e Lauril Sulfato de Sódio-Löwenstein Jensen, foi utilizada a estatística do tipo Kappa (K) . Os resultados obtidos através do cálculo do coeficiente Kappa são comparados pelos valores da tabela de avaliação de qualidade de classificação, proposto por Landis e Koch (1977). O quadro abaixo apresenta intervalos do coeficiente Kappa associados a critérios de

concordância e seus valores distribuídos entre 0 e 1, onde 1 representa o valor da concordância máxima, e quando multiplicado por 100, dá a porcentagem da medida de exatidão da classificação.

Valor de kappa	Concordância
0	Péssima
0,01 – 0,20	Ruim
0,21 – 0,40	Razoável
0,41 – 0,60	Boa
0,61 – 0,80	Muito Boa
0,81 – 1	Excelente

Foi verificada também a sensibilidade (S) e a especificidade (E), da técnica de Ogawa-Kudoh.

Sensibilidade (S)

É a proporção de verdadeiros positivos entre todos os doentes. Expressa a probabilidade de um teste positivo na presença da doença, Isto é, avalia a capacidade do teste detectar a doença quando ela está de fato presente.

$$S = a/b+c$$

Especificidade (E)

É a proporção de verdadeiros negativos entre todos os sadios. Expressa a probabilidade de um teste dar negativo na ausência da doença, isto é, avalia a capacidade de o teste afastar a doença quando ela está ausente.

$$E = d/b+d$$

Valor Preditivo Positivo (VPP)

É a proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com teste positivo. Expressa a probabilidade de um paciente com teste positivo ter a doença.

$$VPP = a/a+b$$

Valor Preditivo Negativo (VPN)

É a proporção de verdadeiros negativos entre todos os indivíduos com teste negativo. Expressa a probabilidade de um paciente com teste negativo não ter a doença.

$$VPN = d/c+d$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos bacteriológicos (baciloscopia e cultura) ainda são prioritários para o diagnóstico da tuberculose, pois permitem a identificação do bacilo, estabelecendo a etiologia da doença, ocupando um papel de fundamental importância na luta contra a tuberculose.

Apesar de existirem técnicas diagnósticas mais modernas, ainda é aconselhável utilizar as estabelecidas, pois as novas em particular, pela biologia molecular, requerem tecnologia sofisticada e recursos elevados, fatores geralmente ausentes nas regiões de alta prevalência da tuberculose. Portanto, o exame bacteriológico como a cultura, ainda é o padrão ouro para o isolamento das micobactérias e para a avaliação de testes diagnósticos (NOGUEIRA et al., 2000).

Na tabela 1 são apresentados os dados relativos à comparação entre resultados Positivos (P), Negativos (N) e Contaminados (C) de culturas processadas pelas técnicas Ogawa-Kudoh (O-K) e Lauril Sulfato de Sódio com semeadura em Lowenstein Jensen (LSSLJ). Observa-se que das 80 amostras, 8 (10%) concordam os resultados positivos para as duas técnicas de cultura, 49 (61,25%) têm resultados negativos concordantes e 12 (15%) foram casos discordantes. O índice de concordância Kappa foi de 45%, classificada como boa. Os dados deste estudo são semelhantes a Farache, et al., (1999) que comparou a técnica O-K com a técnica de Petroff-LJ (PLJ) recomendada pelo Ministério da Saúde, onde observou que em 503 amostras de escarros de pacientes suspeitos e em tratamento da tuberculose agrupando suas amostras positivas, negativas e contaminados, obteve um índice de

concordância Kappa de 46%. Susemihl et al., (1993) avaliaram o método de O-K para isolamentos de micobactérias e encontraram em seus resultados o valor de Kappa de 91%, não levando em consideração amostras contaminadas.

Tabela 1-Comparação entre resultados positivos (P), negativos (N) e contaminadas (C) em culturas executadas pelas técnicas KOK e LSSLJ.

		Técnica de LSSLJ			Total
		Pos	Neg	Cont	
Técnica de Ogawa-Kudoh (O-K)	Pos	8	12	3	23
	Neg	1	49	3	53
	Cont	1	0	3	4
Total		10	61	9	80

K= 45 % S= 88,88% E= 80,33%

Pos= Positivos, Neg= Negativo, Cont= Contaminadas , K= kappa, S=sensibilidade, E=especificidade

Quanto à positividade verifica-se que das 25 amostras com cultura positiva, 23 (92%) cresceram na técnica de O-K e 10 (40%) cresceram no método LSSLJ. Isto mostra que a técnica de descontaminação e cultura O-K permitiram maior descoberta de casos positivos que a técnica LSSLJ. Este estudo demonstra a eficiência da técnica.

Susemihl et al., 1993 comparando os métodos PLJ com o método O-K, encontrou positividade de 34,07% e 32,16%, respectivamente. Coelho, et al., (1999) comparando o método O-K com o método PLJ, encontraram uma positividade de 16,24 % e 13,96 % respectivamente. Farache et al., (1999) obteve um total de 29 (6,97%) amostras positivas em O-K contra 27 (6,49%) positivas em PLJ, igualmente Ribeiro FH. et al. (2006) que comparou o método de Ogawa Kudoh ao método de Lauril Sulfato de Sódio com semeadura em Lowenstein-Jensen em 210 amostras observou uma taxa de positividade no método O-K de 10,9% e LSSLJ de 7,7%.

A centrifugação na técnica LSSLJ teoricamente deveria aumentar o rendimento da cultura por causa da concentração dos bacilos no sedimento para serem inoculadas no meio de cultura. No entanto, tanto neste estudo quanto nos anteriormente descritos, observou-se que o rendimento foi maior para o método O-K que não utiliza centrifugação para concentração dos bacilos (Tabela 1), mostrando assim que este passo para o método O-K é descartável não exigindo assim centrífuga.

Das culturas positivas realizadas pelo método O-K, 3 foram identificadas como micobactérias não tuberculosas (MNT) e 20 foram *Mycobacterium tuberculosis*, indicando

assim, que o método O-K pode ser utilizado para crescimento de várias espécies de micobactérias.

Verificando a sensibilidade (S) e especificidade (E) da técnica O-K em relação ao LSSLJ, o método Ogawa Kudoh apresentou uma taxa satisfatória do teste, 88,88% e 80,33% (Tabela 1), respectivamente. De acordo com Coelho et al., (1999) que avaliaram o método de O-K para isolamento de micobactérias, encontraram em seus resultados uma taxa de sensibilidade (79%) e especificidade (94%). Deve-se observar, além disso, que das amostras discordantes, 12 representam amostras positivas pelo método O-K, mostrando que este método apresenta maior acurácia que o LSSLJ. Este resultado pode ser devido ao método de cultivo do LSSLJ em Rondônia ter iniciado há pouco tempo e existem ainda algumas carências no desenvolvimento do método no LACEN –RO (Tabela 1).

Quanto à contaminação, considerou-se resultado contaminado quando os dois tubos de cada cultura semeados pela técnica O-K ou pela técnica LSSLJ apresentavam contaminação de maneira a não permitir o desenvolvimento de micobactérias e/ou sua leitura. Observa-se um alto índice de contaminação na técnica LSSLJ considerada padrão para o Ministério da Saúde, que apresentou o dobro no índice de contaminação (11,2%) em relação a técnica O-K, que apresentou índice de 5% (taxa aceitável pela WHO). Resultados semelhantes foram encontrados por Ribeiro FH. et al., (2006), que estudaram 210 amostras de escarro de pacientes suspeitos de tuberculose, e encontraram diferenças significativas na taxa de contaminação dos métodos (O-K = 1,9%, LSSLJ = 22,4%).

Segundo Palomino et al. (2007) um laboratório deve usar o melhor método de modo a manter a taxa de contaminação entre 3 % e 5%. Uma taxa da contaminação abaixo de 3 % pode indicar que o procedimento usado é demasiadamente agressivo e podem matar as micobactérias. Se espécimes (especialmente escarro) passar diversos dias para realizar o procedimento de descontaminação o laboratório pode alcançar perda devido à contaminação (WHO,1998).

Todos os agentes disponíveis de digestão/descontaminação são em alguma extensão tóxica aos bacilos da tuberculose; conseqüentemente, para assegurar a sobrevivência do número máximo dos bacilos no espécime, o procedimento de digestão/descontaminação deve ser precisamente seguido (WHO,1998).

A contaminação das culturas é fator preponderante para alteração de resultados e deve ser levada em consideração de forma tal, que cuidados sejam tomados para reduzir ao mínimo

possível a proporção de culturas contaminadas (FARACHE et al., 1999). No ano de 2006 foram realizadas 212 culturas no LACEN-RO, destas 24 (11%) apresentaram contaminação.

Estas informações mostram que o método de O-K apresenta uma eficiência de isolamento de micobactérias, portanto pode substituir o LSSLJ sem prejuízos para a busca de casos no Programa Nacional de Controle da Tuberculose em nosso Estado.

Outro aspecto importante a ser considerado está relacionado ao tempo gasto por cada processo de descontaminação. Pelo processo de Kudoh & Kudoh é possível concluir que, desde a tomada da amostra no recipiente de coleta, passando pelo processo de descontaminação (com o máximo de 2 minutos para permanência do swab na solução de hidróxido de sódio), até a semeadura na superfície do meio sólido, o tempo total não irá ultrapassar 3 minutos por amostra. Considerando que é possível a execução concomitante de descontaminação de duas amostras. Pelo processo de descontaminação de Lauril Sulfato de Sódio (LSS) são necessários 30 minutos de agitação em temperatura ambiente. Trinta minutos de centrifugação e 10 minutos de repouso da amostra. Assim, diante da complexidade do processo, o tempo médio gasto para a descontaminação de amostra de escarro pela técnica de Lauril Sulfato de Sódio é muito maior em relação á técnica descrita por Kudoh e Kudoh .

Outra desvantagem do processo de LSSLJ está relacionado ao tempo maior que o técnico passa manipulando a amostra, o que pode aumentar o risco de rompimento ou abertura dos tubos na centrifuga e a transferência do conteúdo do recipiente plástico de coleta da amostra para o tubo de ensaio, o que pode aumentar o risco de contaminação do manipulador e do ambiente.

A segurança é um aspecto fundamental em laboratório de micobacteriologia, pois o longo período de incubação da tuberculose e a exposição do BK, também fora do laboratório, dificultam identificar se a infecção está ou não associada ao trabalho. Estudos demonstraram que técnicos de laboratórios têm risco cinco vezes maior de contrair tuberculose que os membros da comunidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994).

O crescimento micobacteriano em menor tempo favorece uma resposta mais rápida no diagnóstico e, conseqüentemente, a introdução de quimioterapia específica e quebra da cadeia de transmissão da doença em menor espaço de tempo. O propósito do Programa Nacional de Controle da Tuberculose é reduzir a transmissão do bacilo da tuberculose na população, através das ações de diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005-a).

Foi verificado através de leituras semanais, o tempo de crescimento das colônias para os dois métodos. O total de 23 culturas positivas, no método O-K 4 (17,3%) amostras

cresceram com 14 dias, 16 (52%) amostras cresceram entre os 21-28 dias, enquanto no método LSSLJ, não houve crescimento nos primeiros 14 dias, 6 (60%) das amostras apresentaram crescimento somente a partir de 21 dias, 2 amostras (20%) apresentaram crescimento a partir de 35 dias, e 2 (20%) a partir de 40 dias (Figura 3).

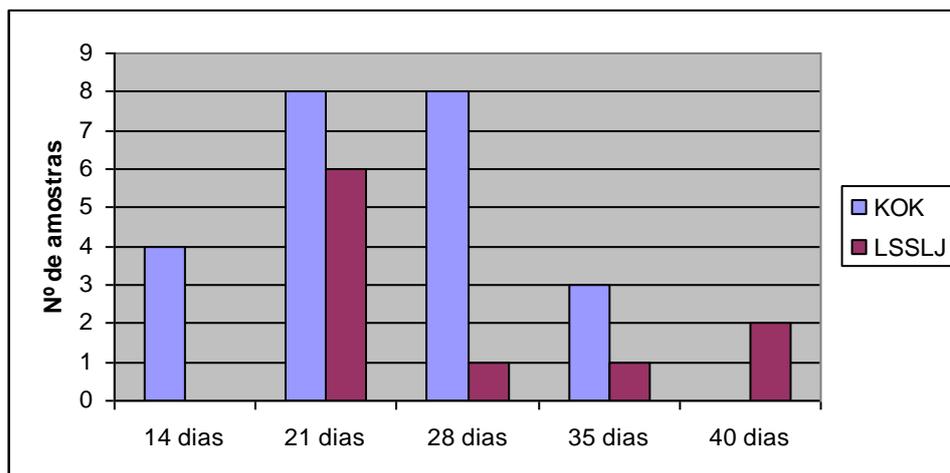


Figura 3-Comparativo entre o tempo de crescimento das culturas, em dias, nos Métodos O-K e LSSLJ.

Observamos neste estudo um índice de crescimento micobacteriano mais elevado (17,6%) no método Ogawa-Kudoh. a partir de 14 dias, comparado com o LSSLJ. Este fato provavelmente se deva ao processo da metodologia do método O-K que realiza a semeadura com “swabs” permitindo uma melhor distribuição bacilar na superfície do meio (Figura 4).

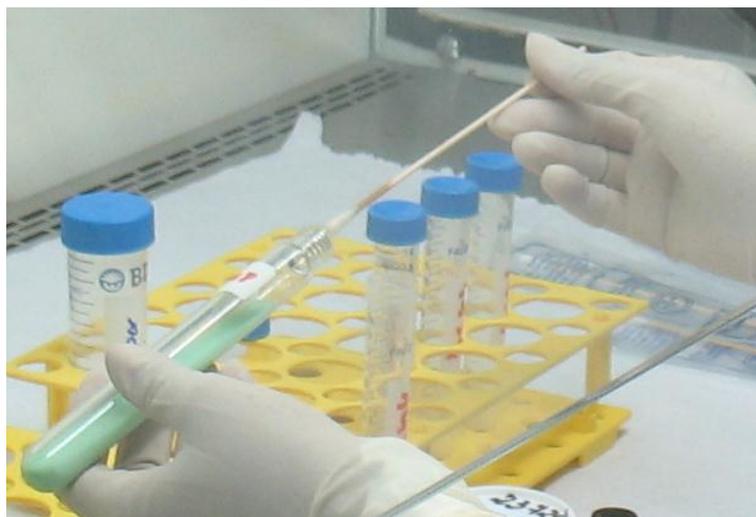


Figura 4 – Semeadura com *swab* no meio Ogawa-Kudoh

O método O-K proporcionou um índice de crescimento bacteriano em menor tempo, semelhantemente observado por Takao, (2005), Susemihl et al., (1993) e Coelho et al., (1999). Outro fator que pode influir pode ser, ser decorrente da diferença, embora pequena, na composição dos meios de cultivo utilizado no método O-K e do meio LSSLJ. (KUDOH e KUDOH, 1974; SUSEMIHL et al., 1993; COELHO et al.,1999).

A Tabela 2 apresenta a relação entre os resultados das baciloscopia diretas utilizando esfregaço de escarro pela técnica de Ziehl-Neelsen e as culturas executadas pelas técnicas O-K e LSSLJ.

Das 19 amostras com baciloscopias positivas, 16 (84,21%) culturas foram positivas no meio O-K e 6 (31,57%) positivas no LSSLJ; 2 (10,53%) culturas foram negativas no meio O-K e 5 (26,31%) negativas para o meio LSSLJ (Tabela 2). As duas culturas negativas e baciloscopia positivas no método O-K não cresceram por não conter material adequado e suficiente para realização do método.

Tabela 2-Resultado da cultura utilizando meio O-K e LSSLJ segundo baciloscopia

Amostras	Meios de cultura							
	N	O-K			LSSLJ			Cont (%)
Pos (%)		Neg (%)	Cont (%)	Pos (%)	Neg (%)	Cont (%)		
Bacilosc Neg	61	7 (11,47)	51 (83,60)	3 (4,91)	4 (6,56)	54 (88,52)	3 (4,92)	
Bacilosc Pos	19	16 (84,21)	2 (10,53)	1 (5,26)	6 (31,57)	8 (42,10)	5 (26,31)	
Total	80	23	53	4	10	62	8	

N= Nº de amostra Bacilosc= Baciloscopia, Neg= Negativo, Pos= Positiva

Nas amostras com baciloscopia positiva, a técnica O-K apresentou vantagens em relação a LSSLJ, sugerindo uma menor agressão no tratamento dos bacilos no processo de descontaminação simplificado (FARACHE et al., 1999).

No método O-K das 61 amostras com baciloscopias negativas, 7 (11,47%) apresentaram culturas positiva, 51 (83,60%) baciloscopia e cultura negativa e 3 apresentaram contaminação. No meio LSSLJ, 4 (6,56%) amostras de baciloscopia negativa apresentaram culturas positivas, 54 (88,52%) apresentaram resultados negativos para baciloscopia e cultura, 3 apresentaram contaminação (Tabela 2).

Nas amostras consideradas paucibacilares, (baciloscopia negativa e cultura positiva) verificou-se que apesar do método O-K não utilizar a etapa de concentração de bacilos pelo processo de centrifugação, este método apresentou maior sensibilidade, 7 (11,47%) enquanto que no LSSLJ 4 (6,56%) (Tabela 2). Castilho et al. (2007) estudando culturas de amostras de escarros pelo método proposto por Ogawa-Kudoh, de 419 pacientes com suspeita de tuberculose pulmonar, 29 apresentaram positividade para *M. tuberculosis*, sendo que 2 (6,9%) foram provenientes de pacientes com baciloscopia negativa. Ribeiro et al. (2005) analisou a utilização do método O-K em quatro Estados do Brasil para os pacientes diagnosticados como casos de tuberculose pulmonar em 2004. No Espírito Santo (ES), foram diagnosticados 79 pacientes, em Mato Grosso do Sul (MS), diagnosticou 51 pacientes, Rio Grande do Sul (RS) diagnosticou 87 pacientes e em São Paulo (SP) diagnosticaram 936 pacientes. A positividade de cultura para os casos de baciloscopia positivas e negativas foi de 75% e 23% (ES); 70% e 25% (MS); 71% e 25% (RS) e 73% e 23% (SP), respectivamente. Estes resultados ressaltam a importância da realização da cultura para o diagnóstico, principalmente para os casos paucibacilares, geralmente obtidos de pacientes pertencentes ao grupo de risco como HIV soropositivos, neoplasias, transplantados entre outros. Isto mostra que os critérios do Programa Nacional de Controle da Tuberculose estão sendo observados e que o método de Ogawa-Kudoh oferece confiabilidade pela positividade encontrada.

A literatura relata que a sensibilidade da cultura pode variar entre 20% a 90%, dependendo da quantidade da amostra submetida à cultura e da infra-estrutura do laboratório no tratamento prévio de descontaminação da amostra a ser cultivada. Dados significativos de pacientes com cultura positiva e que apresentaram baciloscopia negativa, foram obtidos em trabalhos anteriores, demonstrando que a realização da cultura aumenta a cobertura do

diagnóstico precoce da tuberculose, em pacientes paucibacilares (KENNEDY E FALLOW 1979; FRESSATTI-CARDOSO et al., 1998; TAKAO, et al., 2005).

Em nosso estudo os resultados foram semelhantes entre os dois métodos 51 (83,60%) no O-K e 54 (88,52%) LSSLJ nas amostras que apresentaram baciloscopia e cultura negativa, (Tabela 2). A ocorrência de um maior número de amostras negativas confirma que os indivíduos que realizaram o diagnóstico de cultura para tuberculose não apresentam a doença, já que os indivíduos em tratamentos representam apenas 26 (30%) do nosso estudo. Além disso, observou-se também no decorrer deste estudo que muitas das amostras eram inadequadas (material insuficiente ou saliva) e que tanto a estocagem como o transporte das mesmas eram feitas amostras inadequadamente, contribuindo assim para a redução da viabilidade do bacilo.

Verificando-se a sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VP+), e valor preditivo negativo (VP-) do método O-K em relação a baciloscopia, encontrou-se 89%, 88%, 70%, 96% respectivamente. Estes dados indicam a eficiência do método O-K.

A baciloscopia tem sido utilizada como exame básico para o diagnóstico da tuberculose, por ser simples, rápida, confiável e de baixo custo, porém apresenta sensibilidade que varia de 22 a 78% quando comparada com a cultura (TAKAO et al., 2005), além de impossibilitar o isolamento da micobactéria, não permitindo desta forma a identificação da espécie, nem a avaliação do perfil de resistência às drogas antituberculosas. Para obtenção de um resultado positivo na baciloscopia são necessários pelo menos 5.000 bacilos/mililitro de escarro.

Em relação à idade, em Rondônia, na década de 90, no total de casos registrados para tuberculose, 66% ocorreram em indivíduos entre 15 e 49 anos, sendo que 59% eram do sexo masculino (ESCOBAR et al., 2001). Nos anos de 2000 a 2004, a média de casos registrados para tuberculose em indivíduos de 15 a 49 anos foi de 66% e 62 % do sexo masculino (SESAU, 2004).

Neste estudo observamos que 59% dos indivíduos se encontram na faixa etária de 15-49 anos e nota-se um grande número de casos na faixa etária acima de 50 anos (41%) (Tabela 3). Estes dados corroboram a observação que a tuberculose é uma doença que afeta o indivíduo no período mais produtivo da vida (AIT et al., 1997). Entretanto, os estudos recentes mostram um movimento da incidência da tuberculose nos adultos em geral para as pessoas mais idosas (CHAIMOWICZ, 2001; LOPES-PELAYO, 2004).

Foram encontradas diferenças significativas entre o sexo feminino e o masculino (67% e 32%), respectivamente. Geralmente são encontrados mais casos de tuberculose entre

homens do que em mulheres; recentemente postulou-se que uma combinação de fatores biológicos e sociais, com diferenças nos comportamentos, expectativas e atividades, seria a responsável por esta diferença (MATTOS et al., 2006).

Tabela 3-Distribuição dos participantes do estudo segundo o sexo e grupo etário

Grupo Etário	Sexo		Feminino	N	%
	Masculino				
	N	%			
10-19	1	(1%)	-	-	
20-29	4	(5%)		11	(14%)
30-39	5	(6%)		4	
(5%)					
40-49	14	(17%)	8		(10%)
50 +	30	(37%)	3		(4%)
Total	54		26		

O LACEN-RO é o único laboratório responsável no Estado pela realização da cultura, tanto para diagnóstico como para o controle da tuberculose. No entanto, observa-se que dos 52 municípios do Estado de Rondônia apenas 4 (7,7%) estão enviando amostras para cultivo (Tabela 4).

Das amostras analisadas 9% são provenientes dos municípios de Cacoal, 5% Guajará Mirim, destas 30% são de origens indígenas, solicitadas pela Casa de Saúde Indígena-CASAI. Do município de Ji Paraná foram enviadas 3 (4%) amostras e o município de Porto Velho foi o responsável por 80% das amostras deste estudo para realização de cultura (Tabela 4).

Isto indica que no interior a doença não está sendo bem caracterizada, não existindo controle para sua disseminação.

Tabela 4 - Procedência das amostras

Localidades	Nº	%
Porto Velho	64	80
Guajara Mirim	4	5
Ji Paraná	3	4
Cacoal	7	9
Candeias	2	2

No estudo realizado por Mendes de Lima et al, (em preparação), em relação aos exames de cultura em Rondônia no período de 2000 a 2004, observou que 93% do número total de casos notificados não realizaram o exame de cultura, abrindo assim espaço para o diagnóstico presuntivo da doença. A falta de mais laboratório para realização de cultura em nosso Estado contribui para este quadro, sendo que existem municípios em que a baciloscopia, um exame prioritário, não é realizado.

Este estudo se propôs a analisar a técnica de KOK aqui no Estado, para sensibilização junto a Coordenação Estadual de Controle da Tuberculose de Rondônia, para implantação deste método em Unidades de Saúde no interior do Estado, sobretudo em municípios considerados prioritários. Por ser uma técnica simples e possível de ser executada em áreas de difícil acesso, carentes de recursos tecnológicos e humanos especializados em laboratórios e em técnicas mais sofisticadas.

Outro aspecto importante é a possibilidade de execução da cultura a partir de pequena porção de amostra e o menor risco de contaminação do profissional. Permitindo assim, encaminhamento das amostras já cultivadas para o centro de Referência Estadual para ser feita a identificação e o teste de sensibilidade se necessário, como também outros estudos adicionais.

CONCLUSÕES

- O método de descontaminação e cultura descrita por Kudoh-Kudoh mostrou uma elevada vantagem comparada ao método Lowentein-Jensen neste estudo, apesar de equipamentos simples, menor tempo de realização do experimento e uma menor quantidade de amostra necessária para o processamento.

- Apresentou vantagem em relação em ao tempo de crescimento de colônias, principalmente no que se refere a amostras paucibacilares.

- O método Ogawa Kudoh proporcionou maior índice de positividade em relação ao método Lowentein-Jensen.

- O método Ogawa-Kudoh, propicia estudo de sensibilidade/resistência às drogas e a identificação das micobactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*, ou outros.

- Os resultados obtidos neste experimento, reforçam a idéia de que o método simplificado KOK pode substituir o método LSSLJ sem prejuízos para a busca de casos no Programa de Controle da Tuberculose em nosso Estado, principalmente em laboratórios com baixos recursos financeiros e tecnológicos.

RECOMENDAÇÕES

Ampliação da rede de laboratórios para regiões de difícil acesso, nas atividades como descontaminação e semeadura do espécime para posteriormente ser encaminhadas para o Laboratório de Referência-LACEN/RO.

Rever as técnicas utilizadas pelo laboratório, como reagentes para descontaminação, tempo utilizado na manipulação da amostra e período do recebimento da amostra até a realização do exame.

Foi observado um grande número de amostras insuficiente para o exame, indicando assim a necessidade de orientação aos profissionais que desenvolvem atividades junto aos pacientes.

É importante ressaltar que o método Ogawa Kudoh, apresentou extrema relevância no Laboratório de Referência, pois chegou a substituir os exames realizados pelo método Lowenstein-Jensen, quando a cabine de segurança biológica apresentou falha no funcionamento durante a pesquisa.

REFERÊNCIAS

AFIUNE, JB; IDE NETO, J. Diagnóstico da tuberculose pulmonar escarro negativo. **J. Pneumol.**, v.19, p. 37-41, 1993.

AIT ,KN; Enarson D; Billo N. Epidémiologie de la tuberculose et de la résistance aux antituberculeux. **Rev Mal Respir** 1997;14:5S8-5S18.

ALMEIDA, EA et al . Sputum culture yield: comparing an automated diagnostic system to Löwenstein-Jensen medium in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **J. bras. pneumol.** , São Paulo, v. 31, n.3, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?script=S1806-37132005000300009&lng=en&nrm=iso>>. Acesso em: 01 Fev 2008.

ALVES R; Sant'Anna CC; CUNHA AJLA. Epidemiologia da tuberculose infantil na cidade do Rio de Janeiro, RJ. **Revista de Saúde Pública**, v. 34:409-410, 2000.

ARANTES, GR. The predictive value of the standard tuberculin test in BCG-vaccinated children. **Rev. Saúde Pública** , São Paulo, v. 26, n. 4, 1992 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101992000400008> Acesso em: 07 Nov. 2007.

BARATA BARRADAS RC. O Desafio das doenças emergentes e a revalorização da epidemiologia descritiva. **Informe Epidemiológico do SUS** 1999;8: 7-15.

BARRERA L; De Kantor IN. **Nontuberculosis mycobacteria and Mycobacterium bovis as a cause of human, disease in Argentina.** Trop Geogr méd 1987; 39:222-7.

BASTA PC. et al. Survey for tuberculosis in an indigenous population of Amazonia: the Suruí of Rondônia, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 100: 579-585, 2006.

BERGER, HW; MEIJIA, E. Tuberculous pleuriys. *Chest*, v. 63, p. 88-92, 1973.

CASTILHO AL. et al. Avaliação preliminar do diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar pelo método Ogawa-Kudoh em laboratório de referência para a tuberculose na 15ª Regional de Saúde de Maringá, Paraná. **Arq Mudi.** v. 11(1), p. 110, 2007.

CHAIMOWICZ F. Age transition of tuberculosis incidence and mortality in Brazil. **Rev Saúde Publ**, v. 35, p. 81-7, 2001.

CHAN, ED; HEIFETS, L; ISEMAN, MD. Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. **Tuber Lung Dis**, v. 80, n. 3, p. 131-140, 2000.

COELHO, AGV. *et al.* Avaliação do método de Ogawa-Kudoh para o isolamento de micobactérias. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n. 2, p. 57-61, 1999.

CÓ, TR et al. Comparison of pre-treatment mycobacterial load in patients with and without cavitary disease. In: Encontro Nacional de Tuberculose, 1, 2004, Brasília. **Anais do I Encontro Nacional de Tuberculose**, 2004.

ESCOBAR, AL. et al. Tuberculose em populações indígenas de Rondônia, Amazônia, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, vol.17, n.2, p. 285-298 , Mar./Apr. 2001. ISSN 0102-311X.

FILHO, AF; NIERO R; DUQUE JG. Emprego de técnica de cultura simplificada para diagnóstico bacteriológico da tuberculose pulmonar em saúde pública. **Ver. Ciênc. Farm.** São Paulo, v. 20(1), p. 59-75, 1999.

FIUZA DE MELO, FA; HIJAR, MA. Introdução. In: Veronesi R, Focaccia R, ed. **Tratado de infectologia.** São Paulo: Atheneu; p.914-915, 1996.

FIÚZA DE MELO, FA; AFIUNE, JB. Transmissão e imunopatogenia da tuberculose, **J Pneumol**, v.19, p. 19-24, 1993.

FRIEDMAN, CR. et al. Double-repetitive-element PCR method for subtyping Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. **J Clin Microbiol**, v. 33, n.5, p. 1383-1384, 1995.

FRESSATI-CARDOSO, R. et al, Incidência de micobactérias isoladas de material biológico humano no LEPAC durante o período de setembro de 1996 a dezembro de 1997. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, Paranaíba, v.2, n. 2, p. 2002, 1998.

GARG, SK. et al. Diagnosis of tuberculosis: available technologies, limitations and possibilities. **J Clin Lab Anal**, v. 17, n.5 p.155-163, 2003.

GRANGE, JM. **Mycobacteria and Human disease**. 2 Ed. London: University Press, 1996.

GREENBAUM M; BEYT BEJ; MURRAY PR. The accuracy of diagnosing pulmonary tuberculosis at a teaching hospital. **Am Rev Respir Dis** v. 121, p. 477-81, 1980.

HANNA, HA. Diagnosis of tuberculosis by microbiologic techniques. In: ROM, W.N., GARAY, S. **Tuberculosis**. New York: Little Brown, p. 149-159, 1996.

HIJJAR , MA. Tuberculose: desafio permanente. **Cadernos de Saúde Pública**,v. 21: 348-349, 2005.

HUGGETT, JF; McHUGH, TD; ZUMLA, A. Tuberculosis: amplification-based clinical diagnostic techniques. **Inst. J Biochem Cell Biol**, v. 35. n.10, p. 1407-1412, 2003.

KENNEDY, DH; FALLON, RJ. Tuberculosis diagnostic. **J. Am Med Assoc.**, Chicago, v.241, p. 264-268, 1979.

KIM, TC. et al. Acid-fast bacilli in sputum smears of patients with pulmonary tuberculosis. Prevalence and significance of negative smears pretreatment and positive smears post. treatment. **Am Rev Respir Dis**, v. 129, nm. 2, p. 264-268, 1984.

KUDOH, S.; KUDOH, T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. Bull. World. Org., **Santé**, v. 51, p. 71-82, 1974.

Koneman, EW. et al. **Diagnóstico Microbiológico**, São Paulo; 5ª Edição, 2001

KUBY, J. **Imunologia**. 4ª ed. Ed. Revinter. Rio de Janeiro, 2002.

KRISTSKI, AL; CONDEM, B; SOUZA, GRM. **Tuberculose – do ambulatório à enfermaria**. São Paulo, 2ª Edição, Atheneu, 2000.

LANDIS, JR. e KOCH, GG. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observer. **Biometrics**, v.33, p. 363-374, 1977.

LEVY H. et al. A reevaluation of sputum microscopy and culture in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Chest**, v. 95, p. 1193-7, 1989.

LIMA, DM. **Aplicação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Identificação do Mycobacterium tuberculosis em Pacientes e Suspeito da Tuberculose Pleural**. Dissertação, (Mestrado em Clínica Médica) Faculdade de Medicina de Riberão Preto, Universidade de São Paulo, 2001.

LOPES-PELAYO I. et al. Características de la tuberculosis en pacientes mayores de 65 años en el área sanitaria de Cádiz (España). **Rev Méd Chile**, v. 132, p. 325-30, 2004.

MATTOS, et al. Tuberculosis: A Study of 111 Cases in an Area of High Prevalence in the Extreme South of Brazil. **BJID** v. 10, 2006.

MASCARENHAS, MDM; MENDES, MA; GOMES, KRO. Perfil epidemiológico da tuberculose entre casos notificados no município de Piri-piri, Estado do Piauí, Brasil. **Revista do Sistema Único de Saúde do Brasil**, v. 14, n. 1, p. 7-14, 2005. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21445> Acesso em: 12 Out. 2007.

MELLO, FCQ. **Modelos Preditivos para o Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar Paucibacilar**. UFRJ, 2001. Tese (Doutorado em Clínica Médica), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

MENDES DE LIMA, C. **Análise da PCR em Pacientes sob Investigação Diagnóstico para Tuberculose no Município de Porto Velho**. UFRO, 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental), Universidade Federal de Rondônia, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional da Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. **Manual de bacteriologia da Tuberculose**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tuberculose – diagnóstico laboratorial – baciloscopia**. Brasília: Série TELE-LAB, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Comitê Técnico – Científico de Assessoramento à Tuberculose e Comitê Assessor para Co-infecção HIV-Tuberculose. **Tuberculose – guia de vigilância epidemiológica**. Brasília, 2002-a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília:Ministério da Saúde, 2002-b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço**. 5. ed. Rio de Janeiro, 2002-c.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa Nacional de Controle da Tuberculose**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Doenças Endêmicas, Área Técnica de Pneumologia Sanitária. Brasília, 2004-a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Organização Mundial de Saúde. **Gerência de Rede de Laboratórios de Tuberculose**. 2ª edição atualizada. Brasília-DF, 2004-b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE-ANVISA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Brasília. 1. ed. 2004-c. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/manuais/microbiologia.asp>. Acesso em: 22 out 2007

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília:Ministério da Saúde, 2005-a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. **Manual de bacteriologia da Tuberculose**. 3. ed. Rio de Janeiro, 2005-b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE-Vigilância Epidemiológica-PNCT. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21445 . Acesso em: 09 nov 2007-a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde: **relatório de situação : Rondônia / Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2007. Disponível em:http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/caderno_ro_2007.pdf . Acesso em: 07 Out 2007-b.

MITCHISON, DA. The diagnosis and therapy of tuberculosis during the past 100 years. Am **J Respir Crit Care Med**, v. 171, n.7, p. 699-706, 2005.

NOGUEIRA, PA. et al. Análises dos resultados de exames de escarros, provenientes de unidades de saúde, hospitais e presídios do município de São Paulo, para o diagnóstico da tuberculose. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 9, n. 4, p. 263-271,2000.

PALOMINO, JC; LEÃO SC; RITACCO V. **Tuberculosis 2007**. Disponível em: <<http://www.TuberculosisTextbook.com>> Acesso em: 15 out.2007.

PELCZAR J; CHAN ECS; MICHEL J. **Microbiologia**. 2ª edição, São Paulo, 1997.

PEDRO, HSP. et al. Ovo desidratado para substituir ovo “in natura” na preparação do meio Löwenstein-Jensen para cultivo de micobactérias. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 60(2), p. 125-128, 2001.

PIERSIMONI, C. et al. Comparison of MB/Bact Alert 3D system with radioometric BACTEC system and Lowenstein-Jensen médium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study. **J Clin Microbiol**, v. 35, p. 2072-5, 1997.

RIBEIRO, FKC. **Avaliação do crescimento de poucas colônias de *Mycobacterium tuberculosis* em meio de cultura sólido como indicador de contaminação cruzada, utilizando técnicas de tipagem molecular**. Espírito Santo: UFES, 2006. Dissertação (Mestrado em doenças infecciosas), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, 2006.

RIBEIRO, FKC. et al. Evalaution of a commercial test base don ligase chain reaction for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 37, n. 6, p.431-435, 2004.

RIBEIRO, FH. et al. Comparação do método de Ogawa Kudoh com os métodos de Lauril sulfato de sódio e Fosfato Trisódico para cultivo de micobactérias. In: ENCONTRO

NACIONAL DA TUBERCULOSE, II, 2006, São Paulo. Pôster. Núcleo de Doenças Infecciosas-UFES; LACEN-ES; CGLAB-MS, Vol. 32 - Supp. 3, 2006.

RIBEIRO, MO. et al. Contribuição da Cultura para o Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar Usando o Método Ogawa-Kudoh em Quatro Estados do Brasil. In: CONGRESSO DE MICROBIOLOGIA – SIMPÓSIO DE MICOBACTÉRIAS –2005 IPB-LACEN/RS;LACEN-ES -Núcleo de Doenças Infecciosas-UFES;LACEN-MS; IAL – Instituto Adolfo Lutz-SP.2005b.

ROCHA DA SILVA, MT. Determinación de la sensibilidad del método de cultivo Ogawa-Kudoh en el diagnóstico de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud. Disponível em: <http://www.fundacite.org.gov.ve/proyectos/proyecto2.shtml?codigo=1351> Acesso em: 06 out 2007.

ROUQUAYROL MZ; VERAS FMF; FAÇANHA MC. Doenças transmissíveis e modos de transmissão. In: Rouquayrol MZ, Almeida Filho N, ed. **Epidemiologia & Saúde**. 5ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, p.215-270, 1999.

RUNYON, EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease **Med Clin North Am**, v. 43, p. 273-290, 1959.

SESAU. Secretaria Estadual de Saúde. **Informação em Saúde**. Porto Velho, 2004.

SOMOSKOVI, A. et al. Comparison of recoveries of *Mycobacterium tuberculosis* using the automated BACTEC MGIT 960 system, the BACTEC 460 TB system, and lowenstein-Jensen médium. **J Clin Microbiol**, v. 38:2395-97, 2000.

SANTOS, VM. et al. Tuberculose miliar – relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, p. 315-318, 1998.

SILVA Jr. JB. **Tuberculose: guia de vigilância epidemiológica**. J Bras Pneumol 2004; 30 Suppl 1. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132004000700003&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 28 Dez. 2007.

SOOLINGEN DV. et al. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, Canetti: Characterization of an exceptional isolate from Africa. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47(4), p. 1236-1245, 1997.

SUSEMIHL, MAA.MM. et al. Avaliação do método de Ogawa-Kudoh para o cultivo de micobactérias. **Rev. Bras.Patol. Clín.**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 2, p. 51-54, 1993.

TARANTINO, AB; LEITÃO DE OLIVEIRA, MC. Tuberculose. **Arq Brás Méd**, v. 64, p. 123-131, 1990.

TORTOLI, E; CICHERO P; PIERSIMONI C. et al. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study. **J Clin Microbiol** v. 37, p. 3578-82, 1999.

VIANA-NIERO, C; LEÃO, SC. Limitações do uso do fragmento mtp40 como marcador de diferenciação entre *Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis* **J. bras. Pneumol**, v. 30, p. 496-500, 2004

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory Services in Tuberculosis Control, Part III: Culture**. Geneva, Switzerland: WHO. 1998.

WHO (World Health Organization). **Global Tuberculosis Database**. WHO Report. Geneva . Disponível em: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/TB_incidence_2005.png. Acesso em 28 Dez 2007.

YATES MD. GRANGE, JM. Incidence and nature of human tuberculosis due to bovine tubercle bacilli in South – East England: 1977-1987. **Epidemiol Infect** v. 101, p. 225-9, 1988.

TAKAO, EKH. et al. Comparação de métodos de cultivo para o diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar. **Acta Sci. Health Sci. Maringá**, v. 27, n. 2, p. 183-188, 2005.

ANEXOS

Anexo A- Autorização do LACEN-RO para utilização das amostras analisadas

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE SAÚDE
MESTRADO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

Porto Velho, 06 de fevereiro de 2007

Senhora Diretora,
Maria de Lourdes Maciel

Expressando nossos cordiais cumprimentos, informamos que estaremos realizando no decorrer de 2007, uma pesquisa para dissertação de Mestrado em Biologia Experimental / UNIR. Como tema "EFETIVIDADE DAS TÉCNICAS DE DESCONTAMINAÇÃO DO OGAWA KUDOH E LAURIL SULFATO DE SÓDIO", tendo como Orientadora a Prof^ª Dr^ª. Maria Manuela da Fonseca Moura.

A pesquisa tem como objetivo: Analisar e comparar a efetividade do método de descontaminação Ogawa kudoh x Lauril sulfato de sódio em amostras respiratórias oriundas de pacientes com diagnóstico clínico de tuberculose e comparar a baciloscopia com a cultura.

Para tanto solicitamos a colaboração de senhoria, no sentido de autorizar a coleta de amostras e dados junto ao responsável pelo laboratório de bacteriologia para tuberculose e sua equipe.

Na certeza de sermos atendidos, agradecemos desde já e colocamo-nos a disposição para qualquer esclarecimento.

Atenciosamente,

Maria do Socorro Calixto de Oliveira
Maria do Socorro Calixto de Oliveira

Universidade Federal de Rondônia – UNIR/RO
BR 364 KM 9,5 sentido Acre – Porto Velho-RO

Maria de Lourdes Maciel
Diretora Geral UNACENIRO
De acordo em
06/02/07
[Assinatura]

Anexo B - Termo de Aprovação do Comitê de Ética

Fundação Universidade Federal de Rondônia – UNIR
Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Saúde – CEP/NUSAU

Porto Velho, 20 de abril de 2007

Carta 001/CEP/NUSAU

Da: Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Para: Maria do Socorro Calixto de Oliveira
Assunto: parecer ético (informa)

Senhora Pesquisadora,

Informo-lhe que o projeto de pesquisa “Efetividade das técnicas de descontaminação: Ogawa Kudoh e Lauril Sulfato de Sódio para cultura em *M. tuberculosis*”, de sua autoria foi aprovado sem restrição em reunião do Comitê de Ética realizada no dia 17 de abril de 2007. Por consequência, a pesquisa pode ser imediatamente iniciada.

Outrossim, informo-lhe ainda que este Comitê deve ser informado do andamento da investigação, bem como receber cópia do relatório final, quando de sua conclusão.

Atenciosamente,


Prof.^a Ms. Lucinda Maria Dutra de S. Moreira
Coordenadora/ Portaria 308 GR

ANEXO C – Solução de descontaminação do Ogawa-Kudoh

Solução de hidróxido de sódio a 4%

hidróxido de sódio4,0 g

água destilada100,0 mL

Dissolver o hidróxido de sódio na água e autoclavar a 121°C por 15 minutos

Anexo C1-Solução Descontaminante e Fluidificante (Solução “A”)

Pesar em balança de precisão 30g de lauril sulfato de sódio e 10g de hidróxido de sódio, dissolver em 1 litro de água destilada, previamente aquecida a 60° C. Autoclavar a 121° C por 15 minutos. Conservar essa solução à temperatura ambiente.

Anexo C2-Solução Neutralizante (Solução “B”)

Juntar 6,5 ml de ácido fosfórico (H₃PO₄) PA e 2,0ml de azul de bromotimol a 0,4% (Solução C) a 1 litro de água destilada. Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Composição química do meio de cultura

Componentes	Ogawa-Kudoh
Fosfato Monopotássico	2,0g
Citrato de Magnésio	0,1g
Glutamato de Sódio	0,5g
Glicerol	4,0mL
Água Destilada	100,0mL
Homogeneizado de Ovos	200,0mL
Verde Malaquita 2%	4,0mL
pH final do meio	6,4

(a) Solução Sais Minerais (Tampão)

Dissolver os ingredientes, em ordem, em água destilada aquecida. Autoclavar a 121°C por 30 minutos para esterilizar. Esfriar a temperatura ambiente. Esta solução pode ser mantida indefinidamente sob refrigeração.

(b) Solução de Verde Malaquita 2%

Usando técnicas assépticas dissolver o corante na água destilada estéril, colocando na estufa por 1 a 2 horas para melhor dissolução. Preparar esta solução no momento do uso.

(c) Homogeneizado de ovos

Usar ovos de galinhas não alimentadas com antibióticos, recém colhidos (com menos de 7 dias). Limpar os ovos com escova, água morna e sabão alcalino e deixar de molho na água com sabão por 30 minutos. Após, enxaguar com água corrente, deixar de molho no álcool 70% por 15 minutos. Retirar e secar com pano estéril. Antes de quebrar os ovos, lave bem as mãos. Quebre os ovos, um a um, separadamente, num

recipiente estéril para observar a qualidade dos mesmos e colocar no copo do liquidificador estéril para homogeneizar. Filtrar o homogeneizado através de gaze estéril num funil, para um frasco de vidro graduado estéril.

A quantidade de ovos para preparar 1000 ml, depende do tamanho destes, aproximadamente 20 a 25 ovos.

Preparação do Meio Completo

Solução de sais minerais (a)	100 ml
Solução Verde malaquita 2% (b)	04 ml
Homogeneizado de ovos (c) qsp	200 ml

Adicionar (b) solução de verde malaquita ao (a) meio base e após, o (c) homogeneizado de ovos. Manter o meio homogêneo, sob agitação periódica, durante sua distribuição nos tubos. A agitação deve ser suave para evitar a formação de bolhas de ar. Distribuir um volume de 6 a 8 ml em tubos de ensaio estéril de 20 X 150 mm, com tampa de rosca contendo batoque. Coagular imediatamente, sem deixar decantar. Colocar os tubos inclinados no coagulador a 80-85°C por 45 minutos.

Em seguida, os meios são levados para a estufa 37°C por 24 horas para o teste de esterilidade. Os tubos que contiverem alguma contaminação, ou não estiverem de acordo para o uso (volume inadequado, coagulação não completa, presença de bolhas, bisel muito pequeno, aqueles que as tampas se soltarem), serão descartados.

Após essa etapa, os meios são organizados e guardados na geladeira. É anotado na Ficha quantos tubos de meios foram produzidos. O prazo de validade desses meios de cultura é no máximo de 2 meses, em geladeira (4°C), bem acondicionados em sacos plásticos e com a rosca bem fechada.

Anexo G-Protocolo para preparação do meio Lowenstein-Jensen

Composição Química do meio de cultura

Componentes	
Fosfato Monopotássico	0,4 g
Sulfato de Magnésio	0,04g
Citrato de Magnésio	0,1g
Asparagina	0,6g
Glicerol	2,0ml
Água Destilada	100ml
Homogenizado de Ovos	167ml
Verde Malaquita 2%	3,3 ml
pH final do meio	6,8

O meio base (LJ) utilizado pelo LACEN é comprado (Meio comercial: Löwenstein Médium Base). O meio comercial é preparado segundo recomendações do fabricante. Os seus componentes são: Fosfato monopatássico, sulfato de magnésio, citrato de magnésio, L-asparagina, fécula de batata, glicerol, ovos e solução de verde de malaquita a 2%).

O meio hidratado é dissolvido em água destilada, num balão de 2.000ml. Adicionar o glicerol. Esterilizar em autoclave a 121° C por 15 minutos. Depois Esfria o balão em água corrente, agitando-o para que a fécula de batata não fique agarrada no fundo do frasco, formando uma crosta branca e assim possa se distribuir homogeneamente no meio de cultura.

Depois limpa, cuidadosamente, 20 ovos de tamanho médio, com o auxílio de escova, água e sabão. Em seguida enxágua bem em água corrente e submergi em uma solução de álcool etílico a 70% durante 30 minutos. Retira e seca com um pano estéril.

Quebra-se os ovos, um a um, separadamente, em um becker estéril, para observar a qualidade dos mesmos. Transferi-los para um copo estéril de liquidificador ou *mixer* (para uso em laboratório) ou para um balão de 1.000ml com pérolas de vidro. Homogeneizar.

Transferi o homogeneizado para uma proveta de 1.000ml, com auxílio de um funil provido de gaze estéril.

Adiciona o homogeneizado ao meio base. Agitar o balão suavemente. Distribui em volumes de 4 ml em tubos de ensaio com 20 x 150mm e coloca no coagulador em temperatura de 80-85°C por 45 minutos. Após o término da coagulação retiram-se os tubos e incuba a 36° por 24 horas para fazer a prova de esterilidade. Em seguida, não ocorrendo contaminação os tubos são estocados na geladeira com temperatura de 4° C. O prazo de validade desses meios de cultura é no máximo de 2 meses.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características Gerais

As gastroenterites infecciosas em crianças representam a causa mais comum de morbidade e mortalidade principalmente nos países em desenvolvimento. Até os 5 anos de vida, toda criança frequentemente apresenta vários episódios de diarreia por ano, com intensidade variável e potencial para o desenvolvimento de grave desidratação, distúrbios nutricionais e morte (Bern *et al.*, 1992; Parashar *et al.*, 2003).

A gastroenterite pode ser causada por um grande número de patógenos, entre os quais: vírus, bactérias, protozoários e helmintos. Os sintomas clínicos variam desde náuseas, vômito, diarreia, cólicas abdominais, anorexia, cefaléia e mialgia. Podem apresentar-se de forma isolados ou associados (Kilgore & Glass, 1997).

A gastroenterite aguda implica em uma infecção que atinge o sistema gastrointestinal, ocasionando uma série de distúrbios, que resultam em alterações nas funções digestivas, absorptiva e secretória, caracterizada por aumento da frequência das evacuações e/ou diminuição da consistência das fezes por um período de 24 horas, com duração máxima de mais de três a uma semana de etiologia presumivelmente infecciosa.

As infecções diarreicas podem ser veiculadas pela água, alimentos contaminados com microorganismos e/ou toxinas produzidas por eles. As condições inadequadas de higiene é o meio mais prevalente entre crianças que residem nos países em desenvolvimento, e que chegam a desenvolver vários episódios de diarreia ao ano. Todavia as crianças de melhores condições sócio-econômicas, também são acometidas, bem como: adolescentes, adultos e idosos (Kosek *et al.*, 2003).

São várias as condições que favorecem a disseminação da síndrome diarreica. Dentre as principais, destacam-se: o baixo nível educacional das populações, as precárias condições de higiene doméstica e pessoal, ausência de tratamento adequado do lixo e dos dejetos, fornecimento inadequado de água e dificuldade de acesso ao sistema de saúde pública (Gerrant *et al.*, 1983).

Um outro fator de risco de extrema relevância na determinação da diarreia é o desmame precoce, levando à introdução de alimentos nutricionais impróprios e altamente

contaminados, propiciando condições favoráveis para o aumento da incidência da síndrome diarréica (Guerrant *et al.*, 1983; Black *et al.*, 1989).

Os primeiros vírus identificados como responsáveis pela gênese das gastroenterites foram os norovírus, classificados atualmente na família *Caliciviridae*, seguidos pelos rotavírus, astrovírus e posteriormente, os adenovírus entéricos. (Anonymus, 2001).

Os primeiros trabalhos publicados sobre diarréia, possivelmente de etiologia viral, datam da década de quarenta, a partir de estudos relatados por Light & Hodes (1943), os quais relatam o isolamento de um agente que reproduzia experimentalmente a doença em novilhos, a partir do material fecal de crianças com quadro de diarréia.

As técnicas de diagnósticos utilizadas na identificação da etiologia infecciosa das diarréias, até a década de setenta, eram limitadas à pesquisa de bactérias, protozoários e helmintos. Contudo, diversos investigadores já questionavam a implicação dos agentes virais na gênese de várias doenças, uma vez que a maioria dos casos permanecia sem definição etiológica.

Os primeiros achados foram possíveis com a utilização da técnica de microscopia eletrônica (ME), da imunomicroscopia eletrônica (IME) e, posteriormente, por métodos de diagnóstico sorológico e molecular que permitiram a obtenção de maiores informações sobre esses agentes causadores de gastroenterite (Anonymus, 2001).

1.2 Rotavírus

1.2.1 Histórico

Os rotavírus foram descritos pela primeira vez em 1973, na Austrália, por Bishop, quando observou pela microscopia eletrônica, partículas virais em cortes histológicos da mucosa duodenal de crianças com diarréia. Posteriormente partículas semelhantes foram detectadas por Flewett *et al.*, (1973) em amostras fecais de crianças com quadro de gastroenterite aguda, na Inglaterra.

Inicialmente o vírus recebeu várias denominações como “Orbivirus-like”, uma vez que possuía similaridade morfológica com integrante de um gênero antes identificado (Bishop *et al.*, 1973; Kapikian *et al.*, 2001), “Reovirus-like agent” (Kapikian *et al.*, 1974) e Deovirus

(Davidson *et al.*, 1975), esta última relacionada às duas camadas protéicas, observada pela microscopia eletrônica. Posteriormente foi proposto que o vírus formasse um novo gênero, separado dos Reovirus e dos Orbivirus, sugerindo o nome Rotavírus para o novo gênero, por apresentar semelhança morfológica com os membros da família *Reoviridae*. O nome é derivado do latim *rota*, em decorrência da morfologia desses vírus a uma roda. (Flewett & Wood, 1978).

No Brasil, a primeira descrição dos rotavírus foi feita por Linhares *et al.*, (1977), a partir de material fecal proveniente de crianças com quadro de diarreia analisadas através da microscopia eletrônica na cidade de Belém, Estado do Pará, época em que apenas emergiam as primeiras evidências desses agentes como enteropatógenos (Bishop *et al.*, 1973; Flewett & Woode, 1978; Candeias *et al.*, 1989). Desde então, foram realizadas inúmeras investigações em crianças em todo o país, demonstrando a ocorrência de surtos de diarreia associadas ao rotavírus (RácZ *et al.*, 1988; Pereira *et al.*, 1993; Gouvêa *et al.*, 1994; Leite *et al.*, 1996; Timenetsky *et al.*, 1996; Mascarenhas *et al.*, 1999; Cardoso *et al.*, 2003).

1.2.2 Etiologia e Estrutura

Os rotavírus formam um gênero específico dentro da família *Reoviridae*. As partículas maduras exibem simetria icosaédrica, não envelopada, medindo aproximadamente 100nm de diâmetro, sendo compostas por três camadas protéicas concêntricas, designadas como: capsídeo externo, capsídeo intermediário e capsídeo interno (core), que circunda o genoma de ácido ribonucléico, constituído por 11 segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA). Cada segmento codifica uma proteína específica viral. Seis destes segmentos codificam para seis proteínas estruturais (VP1 a VP4, VP6 e VP7) e cinco codificam 5 proteínas não estruturais (NSP1-NSP5) (Prasad *et al.*, 1996; Kapikian & Chanock, 1996; Kapikian *et al.*, 2001; Estes, 2001). O esquema do vírion do rotavírus está representado na Figura 1.

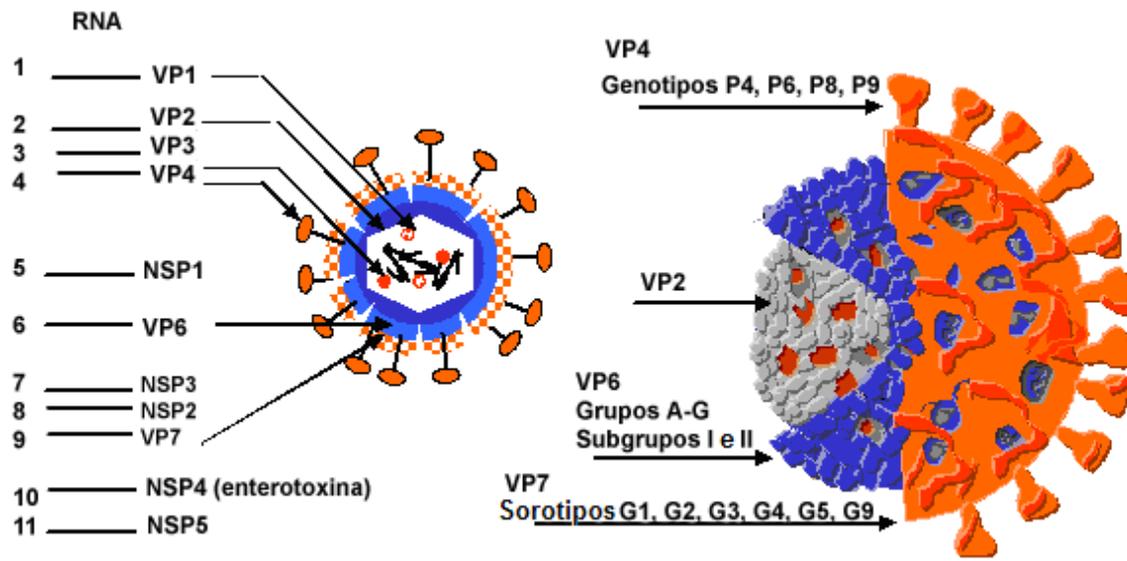


Figura1. Esquema geral da partícula de rotavírus, representando o genoma, as proteínas estruturais e não estruturais, onde cada segmento codifica para uma proteína específica.

A camada protéica mais interna é denominada core, sendo constituída pelas proteínas VP1, VP2 e VP3, estas proteínas formam uma estrutura que contém o material genético dsRNA. A proteína VP1 tem atividade de RNA polimerase dependente de RNA. Entre as proteínas do core, esta é a única que possui uma sequência de reconhecimento ao RNA viral (Lawton *et al.*, 1997; Mertens, 2004). A proteína VP2 constitui o esqueleto e suporte do core viral e é formada por 60 dímeros de proteína que envolvem o genoma, sendo esta a mais abundante com 120 moléculas por *vírião* (Lawton *et al.*, 1997). A proteína VP3 tem atividade de guanililtransferase, envolvida na adição da estrutura 5-*cap*, presente nos RNAs mensageiros virais (Valenzuela *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1992). Essas proteínas em conjunto representam aproximadamente 18% das proteínas virais (Estes, 2001).

A camada intermediária é formada pela proteína VP6, principal portadora dos determinantes antigênicos que permitem classificar os rotavírus em diferentes grupos (A-G) e subgrupos (I, II, I+II, não-I e não-II) (Kapikian & Chanock, 1996; Estes, 2001; Tihova *et al.*, 2001). Os epítomos de reatividade cruzada estão presentes nos grupos, em todas as proteínas estruturais e não estruturais, porém em ensaio de diagnóstico VP6 é o grupo antigênico

predominante detectado, talvez por ser mais abundante (51%) e altamente imunogênica (Kapikian *et al.*, 2001).

A camada externa é composta por duas proteínas, VP4 e VP7, as quais independentemente induzem a formação de anticorpos neutralizantes e são responsáveis pelas interações iniciais do vírus com a célula hospedeira (Kapikian *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2004). A glicoproteína VP7 é codificada pelos segmentos 7 (rhesus) ou 8 (RV bovino) ou 9 (AS-11), dependendo da cepa analisada, determina a especificidade do sorotipo G do vírus. O papel da proteína VP7 durante a interação inicial do vírus não está bem esclarecido, embora tenha sido demonstrado que ela pode modular a atividade da VP4 no processo de adsorção e entrada do rotavírus na célula. Adicionalmente sugere-se que a VP7 pode interagir com moléculas na superfície da célula, após a ligação inicial do vírus através da proteína VP4 (Arias *et al.*, 2002).

A outra proteína não glicosilada VP4, consiste de sessenta dímeros que formam as típicas projeções (espículas), que surgem a partir da superfície viral da partícula completa. A VP4, além de determinar os sorotipos P, ainda tem sido implicada em diferentes funções no ciclo de vida do vírus, incluindo adesão à célula, internalização, hemaglutinação, neutralização e virulência (Shaw *et al.*, 1996; Estes, 2001; Jayaram *et al.*, 2004). Além disso, a proteína VP4 possui um sítio de clivagem pela tripsina, quando submetida ao tratamento com protease *in vitro* produz dois fragmentos do vírion associados VP8 e VP5. O peptídeo VP5 está associado com a atividade de neutralização cruzada entre diferentes tipos de VP4, e possivelmente, possui os epítomos responsáveis pela adsorção do vírus à célula. O peptídeo VP8, por outro lado contém a maioria dos epítomos associados às reações tipo-específicas (Greenberg, 1991; Fiore *et al.*, 1991; Dowling *et al.*, 2000). A clivagem proteolítica provavelmente estabiliza o conjunto de espículas, conferindo ordenamento icosaédrico sobre VP4, tendo como consequência uma potencialização da infectividade viral (Crawford *et al.*, 2001).

As cinco proteínas caracterizadas como não-estruturais são codificadas pelos segmentos genômicos restantes, sendo assim denominadas (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 e NSP5) (Kapikian & Chanock, 1996). Estas proteínas estão envolvidas de forma transitória na replicação viral, dentre estas, destaca-se a glicoproteína NSP4, cujo potencial

enterotoxigênico desencadearia processo diarréico secretório na vigência da infecção pelos rotavírus (Ball *et al.*, 1996; Estes, 2003).

1.2.3 Classificação dos Rotavírus

Os rotavírus apresentam três importantes especificidades antigênicas: grupo, subgrupo e sorotipos. Este critério permite a classificação de múltiplos grupos ou sorogrupos e a existência de múltiplos sorotipos dentro de cada grupo (Kapikian & Chanock, 1996).

Estudos utilizando diversas técnicas sorológicas, entre elas a imunofluorescência e ensaio imunoenzimático, revelaram que os rotavírus possuem um antígeno comum de grupo, presente no capsídeo intermediário VP6 da partícula viral, denominado de antígeno de grupo. Até o momento foram descritos sete diferentes grupos: A, B, C, D, E, F e G (Estes, 2001). Dentre estes, os rotavírus do grupo A, B e C infectam tanto humanos quanto outros animais, sendo que o mais prevalente e melhor caracterizado epidemiologicamente é o rotavírus do grupo A (Kapikian *et al.*, 2001). Os rotavírus do grupo B foram encontrados primeiramente na China, sendo responsáveis predominantemente por diarreia em adultos (Chen *et al.*, 1990). Rotavírus do grupo C causam doenças primariamente em animais, mas tem sido identificado infectando humanos, ocorrem em crianças e adultos, usualmente em casos esporádicos em várias partes do mundo (Penaranda *et al.*, 1989; Jiang *et al.*, 1996; Kuzuyu *et al.*, 1996; Nilsson *et al.*, 2000).

Dentro do grupo A são definidos subgrupos e sorotipos, segundo suas características sorológicas e moleculares. Adicionalmente a especificidade de subgrupo é mediada pela proteína de capsídeo interno VP6, pela presença ou ausência de epítomos imunoreativos frente a determinados anticorpos monoclonais, denominados subgrupo I, II ou não I, não II. (Kapikian *et al.*, 2001; Estes, 2001). O subgrupo II é o mais freqüente entre os humanos, enquanto o I é o mais detectado entre as amostras de origem animal (Iturriza-Gómara *et al.*, 2002).

Os rotavírus são classificados em sorotipos definidos pela reatividade do vírus frente a dois antígenos independentes e neutralizantes do capsídeo externo: VP4 e VP7. Assim, pode-se caracterizar o sorotipo mediado pela VP7, denominado sorotipo G ou proteína G, por ser

VP7 uma glicoproteína, enquanto VP4 é denominada sorotipo P, por ser proteína sensível a protease (Estes, 2001; Kapikian *et al.*, 2001; Iturriza-Gómara *et al.*, 2003).

Devido a grande diversidade de genótipos existentes, tornou-se necessária uma nomenclatura consenso entre os autores para definir tanto sorotipos como genótipos de rotavírus. Por exemplo, considere-se a amostra viral protótipo “Wa”, de origem humana, classificado como sorotipo P1A, genótipo (também P) 8 e tipo G1; a nomenclatura desse isolado seria P1A[8]G1. Cabe ressaltar que para a classificação de G, os sorotipos e genótipos têm números correlacionados. Enquanto que os P não existem correlação.

De acordo com a diversidade genética e antigênica do rotavírus do grupo A, 15 diferentes sorotipos G e 26 P têm sido descritos, e destes 10 G e 11 P são associados com infecções em humanos (Kapikian *et al.*, 2001; Santos & Hoshino, 2005; Martella *et al.*, 2006). Os sorotipos G1-G4 são os principais responsáveis pelos episódios de diarreia no mundo, e para os quais vacinas estão sendo desenvolvidas. Enquanto apenas, quatro sorotipos P são os mais prevalentes P[4], P[6], P[8], e P[9] (Estes, 2001).

Embora exista uma ampla diversidade de tipos de rotavírus infectando humanos, a maioria dos isolados de diarreia em crianças pertence a quatro combinações de G/P, como segue: P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 e P[8]G4. Destes P[8]G1 e P[4]G2 são os mais comuns encontrados no mundo (Gentsh *et al.*, 1996; Santos & Hoshino, 2005). Mais recentemente, amostras P[8]G9 e P[6]G9 tem emergido globalmente como combinações de tipo G e P prevalente encontrados na Índia e Estados Unidos em infecções humanas (Hoshino & Kapikian, 2000). Amostras G12 têm sido detectadas na Tailândia, USA, Índia, Japão, Argentina e Coreia, (Pongsuwanna *et al.*, 2002; Griffin *et al.*, 2002; Das *et al.*, 2003; Santos & Hoshino, 2005).

1.2.3.1 Características do Genoma

Os rotavírus representam os únicos agentes virais conhecidos por possuir 11 segmentos de dsRNA infectando tanto mamíferos como aves. O genoma completo dos rotavírus apresenta 18.550 pares de bases (pb), com tamanhos variando entre 663 a 3.302 pb. Estas diferenças de tamanhos permitem que os segmentos quando separados eletroforeticamente apresentem um padrão ou perfil característico típico e único, o qual tem

sido utilizado como base para desenvolvimento de método de diagnósticos. O padrão eletroforético dos rotavírus grupo A apresenta 4 segmentos de RNA de alto peso molecular (segmentos de 1 a 4), 5 segmentos de médio peso molecular (segmentos de 5 a 9) e 2 segmentos de baixo peso molecular (segmentos 10 e 11), os quais migram no gel de acordo com o seu peso molecular (Kapikian & Chanock, 1996). Esse grupo é ainda caracterizado por três distintos perfis que representam um dos mais úteis critérios para a classificação desses vírus em padrão eletroforético, baseado apenas na diferença de mobilidade do segmento 11, gerando “perfil longo”, e segmento 10, “perfil curto” ou “super curto”. Em geral se observa uma boa correlação entre estes perfis com o subgrupo e sorotipo G, sendo que as correlações mais encontradas são subgrupo I perfil curto sorotipo G2, subgrupo II perfil longo sorotipos G1, G3 e G4 ou G9 e subgrupo I perfil super curto sorotipo G8 (Kapikian *et al.*, 2001).

Os grupos de rotavírus de B a G revelam migração no gel completamente diferente, dependendo do grupo a que pertença, sendo estes denominados rotavírus atípicos Figura 2 (Estes, 2001).

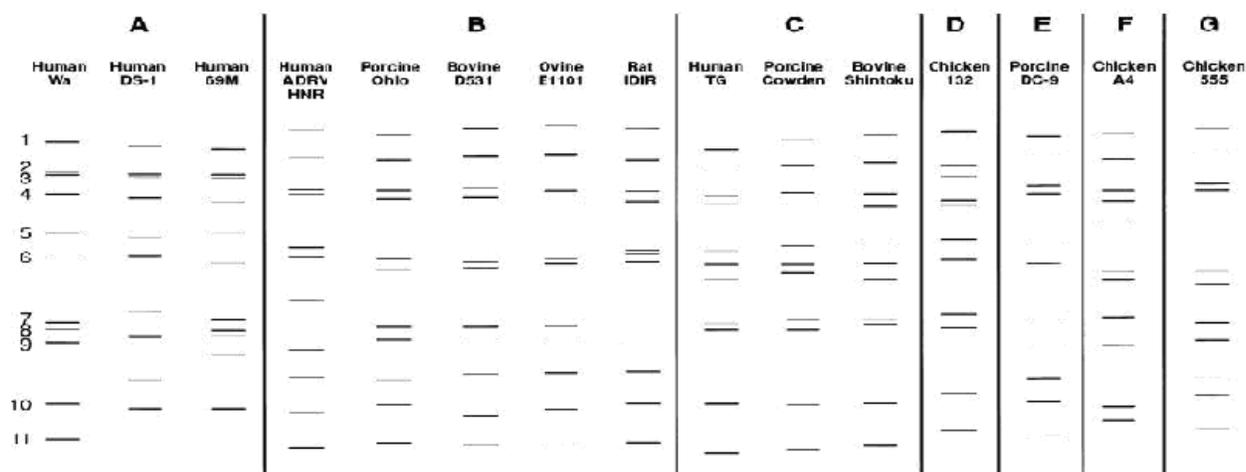


Figura 2. Esquema representativo dos eletroferotipos dos diferentes grupos de rotavírus analisados em gel de poliacrilamida. (Adaptada de Kapikian & Chanock, 2001).

As partículas virais contêm sua própria RNA-polimerase, RNA-dependente a fim de transcrever cada segmento de RNA em RNA mensageiros virais. Cada segmento de RNA, no sentido 5' inicia com uma guanidina, seguida de uma seqüência conservada, que faz parte da

região 5' não codificante. Cada um dos segmentos de RNA fita dupla possui uma região ORF (*open reading frame*), que codifica para os produtos protéicos. A ORF é finalizada em um *stop códon*, seguido de outra seqüência conservada, agora localizada na região 3' não-codificante, terminando assim, com duas citosina na extremidade 3' Figura 3 (Estes, 2001).

A análise comparativa das seqüências nucleotídicas dos onze segmentos tem revelado que existem várias características comuns entre todos os segmentos. Os primeiros 10 nucleotídeos da extremidade 5', assim como os últimos 8 nucleotídeos da extremidade 3' estão altamente conservados entre todos os segmentos das diferentes cepas. A alta conservação destas seqüências sugere que estas regiões apresentam sinais que são importantes para a transcrição, transporte de RNA, replicação, montagem e/ou empacotamento dos segmentos genômicos (Patton & Spencer, 2000).

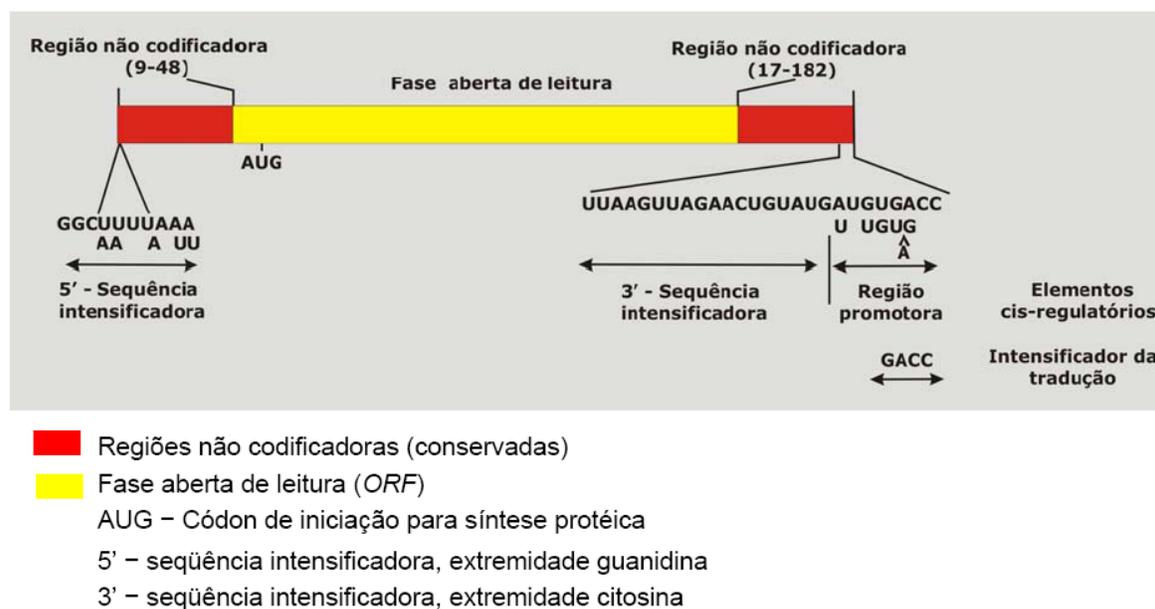


Figura 3. Representação esquemática de um dos segmentos genômicos do rotavírus (adaptada de Taniguchi & Urasawa, 1995).

Um dos aspectos mais observados nos estudos de diversidade genética entre os rotavírus, tem sido o polimorfismo eletroforético exibido pelos segmentos de dsRNA. A diversidade está relacionada com diferentes mecanismos genéticos como mutações pontuais, reestruturação (reassortment) e rearranjos.

Mutação pontual consiste em alterações na sequência de nucleotídeo que ocorrem durante a replicação do genoma. O acúmulo de mutações pontuais tem sido observado em isolados, obtidos durante uma única epidemia (Palombo *et al.*, 1993). Estas alterações levam a substituição nos aminoácidos da proteína codificada, podendo alterar o sítio antigênico, resultando em cepas resistentes aos anticorpos neutralizantes produzidos contra as cepas parentais (Taniguchi & Urasawa, 1995).

Reestruturação consistem em mudança do genoma que ocorre devido a troca de segmento de dsRNA entre diferentes cepas virais (Estes & Cohen, 1989). Este fenômeno que ocorre em vírus com genoma segmentado é denominado pseudo-recombinação em outros vírus. Através deste mecanismo, novas cepas virais podem surgir rapidamente e a co-infecção entre cepas geneticamente próximas promove o mecanismo de forma mais eficiente. As cepas originadas por estes processos são chamadas de reestruturadas (Taniguchi & Urasawa, 1995).

Rearranjos são alterações consideráveis dentro de um segmento genômico, algumas vezes ocorrendo em forma de deleções ou duplicação de bandas na maioria dos casos, principalmente duplicação parcial na região codificante. Estas alterações levam a modificações na massa molecular dos segmentos de dsRNA, resultando em um perfil eletroforético distinto daquele original (Taniguchi & Urasawa, 1995). Rearranjos foram primeiramente detectados em vírus de humanos imunocomprometidos (Pedley *et al.*, 1984; Hundley *et al.*, 1987) e posteriormente em humanos imunocompetentes com diarreia.

1.2.3.2 Ciclo de Replicação e Patogenia

Estudos têm sugerido que os rotavírus podem entrar na célula através de dois mecanismos: penetração direta na membrana celular (tripsinização de VP4) ou endocitose, Figura 4 (Estes, 1996). Entretanto, apenas o primeiro mecanismo, por ser o mais estudado, será evidenciado neste trabalho.

Através da adesão direta, a proteína VP4 na superfície externa do Rotavírus é fracionada pelas enzimas pancreatina, tripsina ou elastase em duas subunidades de proteínas menores VP5 e VP8 que são importantes no processo de internalização das partículas nas células (Zarate *et al.*, 2000). Em seguida o vírus adere às células do epitélio intestinal através de receptores da membrana celular, como: gangliosídios, glicoproteínas, galactose, ácido

siálico e integrinas entre outros, conseqüentemente o vírus atravessa para dentro do citoplasma, onde as proteínas do capsídeo externos são removidas (Ciarlet & Estes, 1999; Jolly *et al.* , 2000; López & Arias, 2003, López & Arias, 2004). Este processo produz ativação da RNA polimerase, RNA dependente que sintetiza transcritos de RNA em mRNA virais, os quais são traduzidos para síntese de proteínas estruturais e não estruturais do vírus (Estes, 1996). Durante esta fase de duplicação a fita simples de mRNA é usada como template para a síntese da fita negativa, gerando o segmento de RNA de fita dupla. Uma vez que as partículas de duplo capsídeo estão formadas, elas deixam os viroplasmas (estruturas eletrodensas, onde é sintetizada a maioria das proteínas virais) e vão para o interior do retículo endoplasmático adjacente (Estes, 2001; Lopes & Arias, 2004).

Duas proteínas são sintetizadas em associação com o RE e estão glicosiladas: a proteína estrutural VP7, que forma o capsídeo externo, que é sintetizada no retículo e se mantém associada à membrana deste; e a proteína não-estrutural NSP4, também glicosilada e expressa na membrana do RE, possui domínio transmembrana voltados para o citoplasma da célula. Este domínio citoplasmático funciona como receptor de partículas de duplo capsídeo, interagindo diretamente com VP6 e VP4, viabilizando o brotamento das partículas de duplo capsídeo para o interior do RE. Durante este processo as partículas adquirem um envelope transitório que se perde durante a passagem no RE. Em seguida, ocorre a montagem das proteínas do capsídeo externo, o que resulta na formação de partículas virais maduras. As partículas maduras acumulam-se no lúmen do retículo até serem liberadas pela lise celular (Estes, 2001; Jayaram *et al.*, 2004; Lopes & Arias, 2004).

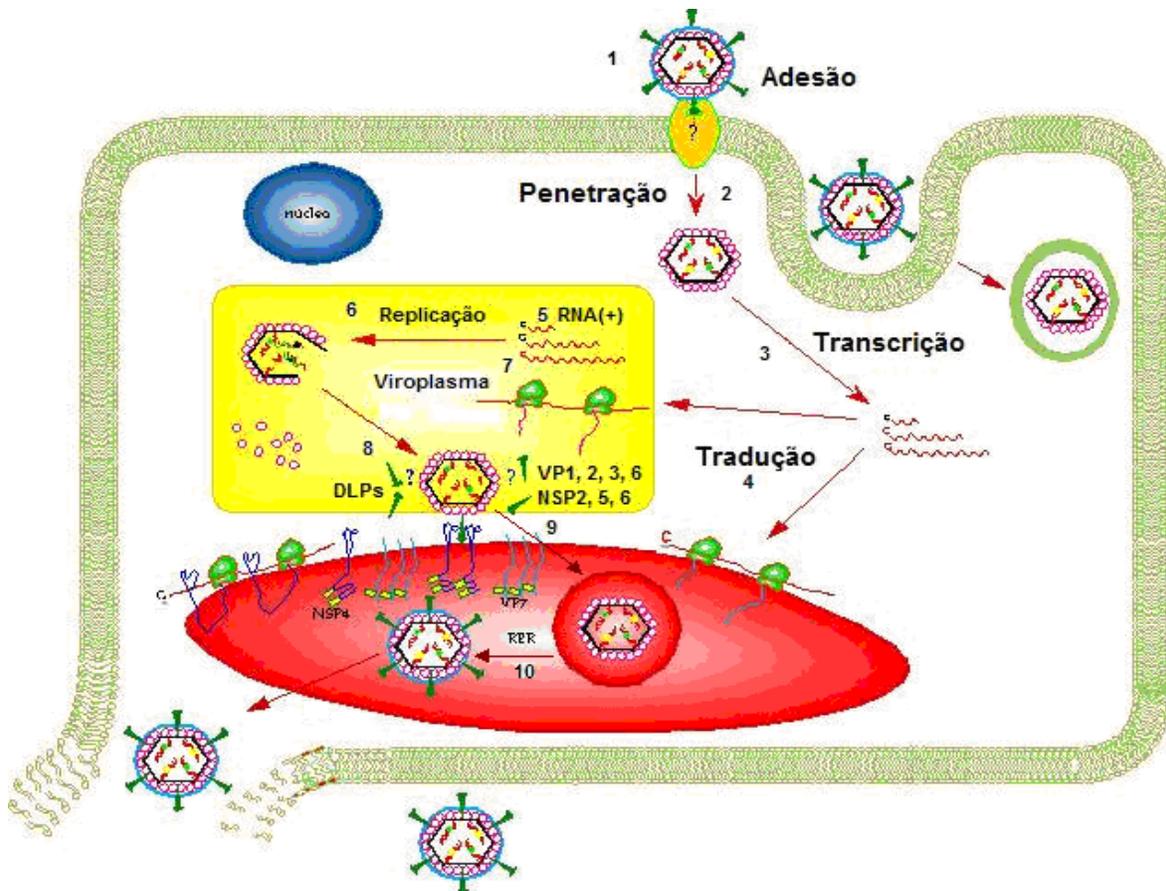


Figura 4. Modelo esquemático das principais etapas do processo de replicação intracelular dos rotavírus (Adaptada de López & Arias, 2004).

As etapas de replicação estão indicadas nos números: **1. Adsorção ao receptor celular ou penetração direta; 2. Perda do capsídeo externo VP4 e VP7; 3. Produção de mRNA no citoplasma; 4. Tradução do mRNA em 6 proteínas estruturais e 5 não estruturais; 5. Síntese primária de fitas negativas de RNA; 6. Montagem da partícula viral; 7. Síntese secundária de fitas negativas de RNA; 8. Montagem das partículas de DLPs (Partículas de duplo capsídeo); 9. Brotamento das partículas de DLP na membrana do RE; 10. Perda do envoltório transitório e geração do vírions maduros com triplo capsídeo.**

Os rotavírus apresentam tropismo por enterócitos diferenciados maduros das porções média e alta das vilosidades do intestino delgado, em particular aqueles que integram a mucosa jejunal. (Lundgren & Svensson, 2001). Durante a multiplicação dos vírus nos

enterócitos ocorrem morte e descamação dessas células, que são substituídas por células imaturas das criptas intestinais, as quais têm capacidade de absorção reduzida, sugerindo que daí advenha o fenômeno osmótico desencadeante do processo diarréico (Prasad & Estes, 1997). Com efeito, a extensa lesão epitelial determinada pelos rotavírus compromete a absorção de sódio, glicose e água. A esses eventos sobrepõem-se a expressiva depressão nos níveis das enzimas intestinais (dissacarídases), tais como lactase e sacarase, sobrevivendo má absorção dos carboidratos presentes no lúmen intestinal. Os rotavírus só se multiplicam nas células epiteliais maduras das vilosidades do intestino delgado proximal para o distal. Geralmente existe lesão das células superficiais da mucosa, sem alteração inflamatória na lâmina própria, nas placas de Peyer, ou invasão de outros órgãos (Linhares *et al.*, 2002; Glass *et al.*, 2005).

Outras lesões têm sido relacionadas com rotavirose, como a infiltração mononuclear da lâmina própria, distensão da cisterna do retículo endoplasmático, dilatação mitocondrial e presença de microvilosidades esparsas e irregulares. A deficiência de lactase associada à infecção por rotavírus é comum, especialmente em desnutridos, que costumam apresentar evolução mais prolongada do quadro (Bishop *et al.*, 1973; Linhares *et al.*, 2002).

Existem poucos estudos sobre a ação patogênica dos rotavírus em humanos; nos que realizaram biópsia não foram encontradas lesões histológicas no intestino delgado. Isto indica que a diarréia pode ocorrer na ausência de dano celular (Glass *et al.*, 2005). Ainda não se conhecem com precisão os mecanismos pelos quais os rotavírus causam diarréia, mas a proteína não estrutural NSP4 parece desempenhar importante papel. Em animais infectados experimentalmente, a NSP4 atua de forma semelhante à enterotoxina da *E. coli*. Esta proteína parece interagir com um receptor específico na superfície dos enterócitos, ativando uma via sinalizadora transducional que promove o aumento dos níveis de cálcio intracelular, aumentando assim a permeabilidade da membrana plasmática ao cloro e conseqüentemente o efluxo de cloro e água, induzindo a diarréia caracterizada como secretora Figura 5 (Estes *et al.*, 2001).

As mais recentes descobertas configuram um terceiro mecanismo no tocante à diarréia por rotavírus: o envolvimento do sistema nervoso autônomo intestinal como efetivo indutor da secreção de líquidos e eletrólitos (Lundgren *et al.*, 2000; Lundgren & Svenson 2003).

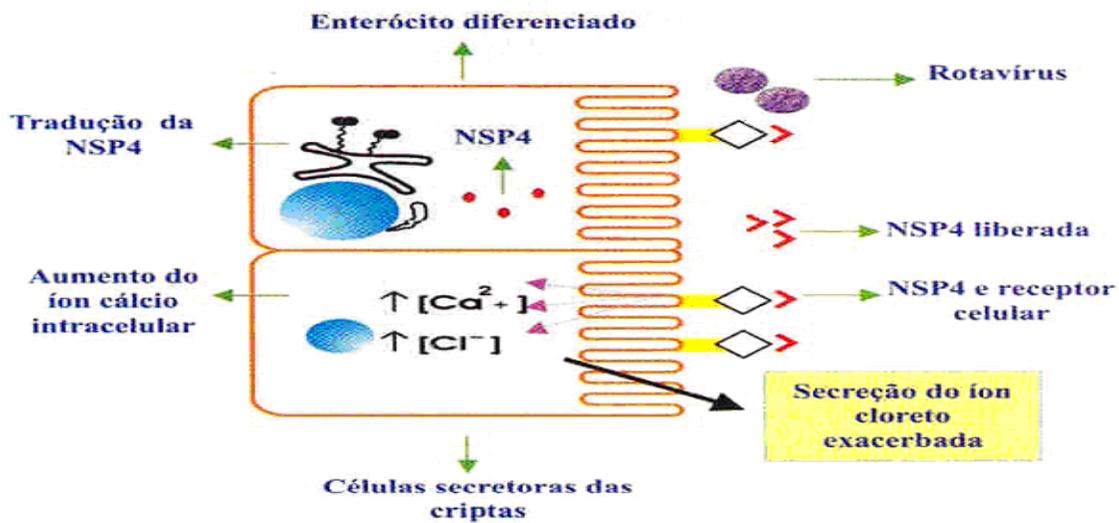


Figura 5: Modelo representando o processo de indução da diarreia, ocasionado pela entrada de rotavírus no interior da célula intestinal.

1.2.4 Epidemiologia

Nos países desenvolvidos, a diarreia aguda é considerada um grave problema de saúde pública e está associada a uma elevada morbidade e substancial número de hospitalizações entre crianças e idosos. As intervenções necessárias ao tratamento e controle das diarreias nestes países acarretam grande aumento nos custos diretos e indiretos dos sistemas de saúde (Kapikian, 1996; Glass *et al.* 2000; Maltezou *et al.*, 2000).

Por outro lado, nos países em desenvolvimento da África, Ásia e América Latina, estima-se que a cada ano ocorram cerca de 744 milhões a um bilhão de casos de diarreia em crianças com menos de 5 anos de idade. Destas, acredita-se que 2,4 a 3,3 milhões vão a óbito por ano, o que corresponde a 6.600 a 9000 de mortes por dia (Linhares & Bresse, 2000).

A etiologia das diarreias é bastante complexa e podem envolver diferentes agentes como vírus, bactérias e parasitas. A importância relativa dos agentes é variável e o predomínio de um agente etiológico em países, regiões ou mesmo sua distribuição sazonal está diretamente relacionado com a frequência e intensidade com que medidas de controle são adotadas. Estudos indicam que, tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento, a maioria dos casos de diarreia tem sido atribuído à etiologia viral (Bern & Glass, 1994; Kapikian & Chanock, 1996; Kapikian *et al.*, 2001; Wilhelmi *et al.*, 2003).

Os vírus são reconhecidos como os mais importantes agentes causadores de gastroenterites graves, principalmente em crianças (Aho, *et al.*, 2000). Nos países desenvolvidos cerca de 70% a 80% das gastroenterites em crianças é de etiologia viral como: Norwalk vírus, Sapporo vírus, Astrovírus, Adenovírus, Calicivírus e principalmente, Rotavírus do grupo A, sendo este o mais implicado com a diarreia (Aranda-Michel & Gianella, 1999).

Os rotavírus representam a mais importante causa de gastroenterite grave na infância, tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento (Kapikian *et al.*, 2001). Globalmente, estima-se que, 130 milhões de crianças desenvolvam diarreia relacionada ao rotavírus a cada ano, 18 milhões das quais experimentam desidratação moderada a grave, resultando em mais de 400.000 mortes, sendo que 85% destas ocorre em países de baixa renda da África, Ásia e América Latina (Miller & McCann, 2000; Molbak *et al.*, 2001; Parashar *et al.*, 2003).

Sabe-se que todas as crianças serão infectadas por rotavírus pelo menos uma vez, até aos 3 anos de idade (Bern & Glass, 1994; Kapikian *et al.*, 2001). Mas as conseqüências destas infecções diferem drasticamente, dependendo do status econômico de cada país. Nos Estados Unidos, por exemplo, estima-se que anualmente os rotavírus sejam responsáveis por cerca de 500.000 atendimentos médicos, 50.000 hospitalizações e aproximadamente 20 a 40 mortes (Parashar *et al.*, 2003).

Na União Européia foi estimado que 3,6 milhões de episódios de diarreia por rotavírus ocorrem anualmente entre crianças menores de 5 anos de idade. E a cada ano as infecções por rotavírus são responsáveis por aproximadamente 231 óbitos, 87.000 hospitalizações e 700.000 consultas médicas (Soriano-Gabarro *et al.*, 2006).

Em países em desenvolvimento, as estimativas indicam que os rotavírus são responsáveis por 18 milhões de casos de diarreia, acarretando entre 600.000 a 870.000 mortes/ano (Murphy *et al.*, 2001).

No Brasil, vários foram os estudos até então empreendidos, abrangendo as diferentes regiões, com base nas quais se determinaram múltiplas taxas relativas à prevalência das doenças diarreicas por rotavírus entre crianças com idade inferior a 6 anos de idade. Em termos gerais, a freqüência de diarreias associadas ao rotavírus variou de 12 a 42%, sendo

que os índices de positividade por região, ressaltam-se o Norte com 36,5%, Nordeste 25%, Centro-Oeste 24%, Sudeste 22% e Sul com 42% (Linhares, 2000).

Estudos sobre infecções nosocomiais indicam que uma em cada 60 crianças hospitalizadas por doença não-diarréica desenvolve diarreia associada à infecção por rotavírus (Kapikian *et al.*, 2001). No Brasil, dados mostram que até 40% dos casos de diarreia em hospitais de pediatria de Belém estão relacionados com infecções de rotavírus (Gusmão *et al.*, 1995). Estudos conduzidos por O'Ryan *et al.*, (2001), envolvendo três países da América do Sul, indicam que os rotavírus determinam 29 a 39% dos quadros diarréicos infantis, no âmbito de consultórios médicos. Se consideradas as hospitalizações, esses autores registram taxas de prevalência que ascendem a 71 %. Steele *et al.*, (2003), a partir da análise de 30.000 amostras fecais no continente africano, demonstraram que 20 a 40% das gastroenterites infantis primariamente detectadas nos hospitais se relacionam aos rotavírus.

Na Ásia, o estabelecimento de extensa rede envolvendo 36 hospitais distribuídos em nove países desse continente, relacionou os rotavírus a 45% dos quadros diarréicos agudos entre crianças com idades inferiores a 6 anos (Bresee *et al.*, 2004).

A principal via de transmissão dos rotavírus é a fecal-oral. Ainda especula-se que o contato pessoa a pessoa, contato com secreções respiratórias e o contato com superfícies contaminadas possam ser fontes de transmissão, já que os altos índices de diarreia por esses vírus nos três primeiros anos de vida em todo mundo são independentes das condições higiênicas e sanitárias.

A sintomatologia clínica das infecções por rotavírus traduz-se por uma diarreia aguda caracterizada pelo aumento do número de evacuações, com fezes aquosas ou de pouca consistência, com frequência acompanhada de vômito, febre e dor abdominal, alguns casos há presença de muco e sangue. Tem duração de dois a quatorze dias, sendo assim, autolimitada. A perda de fluidos e eletrólitos devido ao vômito e diarreia pode levar a uma desidratação grave, hospitalização e morte, especialmente em bebês e crianças subnutridas (Wickelgren, 2000). O efeito deletério viral é de natureza lítica, onde as células epiteliais imaturas que reconstituem o tecido possuem níveis reduzidos de dissacaridases, incluindo lactase, e o transporte de sódio e glicose é prejudicado. Como consequência, observa-se um quadro diarréico de natureza osmótica, havendo, em geral, a necessidade de tratamento que consiste

primariamente da reposição de fluido e eletrólitos tanto pela via oral quando endovenosa (Pérez-Vargas *et al.*, 2006).

Em relação à ocorrência temporal é nítido o padrão sazonal que assume nos países de clima temperado, com maior expressão nos meses mais frios, ou seja, ao final do outono, inverno e primavera (Cook *et al.*, 1990; LeBaron *et al.*, 1990; O’Ryan *et al.*, 1996). Em contrapartida, tais picos de incidência inexistem ou não se revelam tão marcantes nas zonas tropicais e subtropicais do planeta, onde as infecções por rotavírus ocorrem ao longo de todo o ano (Cook *et al.*, 1990; Cunliffe, 1998, Kapikian *et al.*, 2001).

1.2.5 Imunidade e Profilaxia

Após a infecção natural por rotavírus, apenas 38% das crianças apresentaram imunidade completa contra reinfecção, mas a proteção é maior para as formas moderadas e graves da doença (77 a 87%). Os fatores do hospedeiro que determinam a recuperação das infecções ainda não estão claramente definidos. A presença de IgM sérica específica, só aparece 7 dias após a infecção natural ou imunização; a IgA secretora específica é detectada na saliva, no suco duodenal e nas fezes, após 7 a 28 dias (Linhares *et al.*, 2002; Glass *et al.*, 2005).

A proteção contra a reinfecção parece estar, parcialmente, relacionada aos anticorpos neutralizantes e à imunidade da mucosa mediada pela IgA secretora. Entretanto, existe variação na proteção contra a infecção homeotípica (cepa que causou a infecção) e heterotípica (contra outras cepas antígenicamente diversas da cepa que causou a infecção). A resposta imunológica a primoinfecção é homotípica e a resposta às infecções subsequentes é mais ampla, com a produção de anticorpos heterotípicos (Linhares, 2000; Linhares *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2002).

A imunidade de mucosas, mediada pela IgA secretora, parece desempenhar papel mais relevante do que a imunidade humoral na proteção contra os rotavírus. Estas imunoglobulinas são anticorpos não neutralizantes dirigidos contra a proteína VP6, que é o antígeno de grupo comum a todos os rotavírus do grupo A. As imunoglobulinas de classe IgA inativa os rotavírus dentro das células epiteliais, durante o processo de transcitose; e altos

níveis de IgA secretora nas superfícies mucosas oferecem proteção completa contra a reinfecção sintomática (Velazquez *et al.*, 2000; Linhares *et al.*, 2002).

Os títulos de anticorpos séricos neutralizantes contra as proteínas VP4 e VP7 apresentam grandes variações após a infecção natural, e seu papel na proteção contra infecção e reinfecção ainda é controverso. Há evidências crescente quanto à importância que exerce a imunidade mediada por células, em particular quanto à eliminação dos vírions infectantes na mucosa intestinal (Offit, 1996). Tal processo envolve principalmente os linfócitos T (CD8+ e CD4+) do trato gastrointestinal. Em princípio, os linfócitos B assumiriam importância frente à infecção por rotavírus associando-se à produção de anticorpos específicos das classes IgA e IgG, enquanto os linfócitos T determinariam a resolução do processo infeccioso propriamente dito (Bernstein, 1994; Ward, 1996).

A maioria dos rotavírus compartilha os principais antígenos VP6, fato que possibilita a imunização através do uso de vacinas contendo cepas isoladas de animais. A primeira vacina oral contra rotavírus testadas em humanos, era monovalente e continha a cepa Nebraska (RIT4237), isolada de bovino. Embora essa vacina tenha conferido razoáveis taxas de proteção nas crianças da Finlândia, a proteção foi baixa nas que vivem em países em desenvolvimento. Para conter esse problema foram desenvolvidas vacinas multivalentes, contendo cepas reagrupantes com genes de RVh (rotavírus de humanos) e RVa (rotavírus de animais).

Em agosto de 1998, a Food and drug Administration (FDA), Estados Unidos, licenciou a RRV-TV (Vacina tetravalente recombinante de origem símio-humana) denominada *Rotashield*®, para uso rotineiro via oral, em três doses. A vacina licenciada consistia de uma composição de três especificidades antigênicas para G1, G2 e G4, obtidas *in vitro*, envolvendo RV de origem humana e símia (RRV) e a própria estirpe RRV, homóloga ao genótipo G3. A eficácia dessa vacina foi avaliada em estudo envolvendo crianças em vários países. Nos Estados Unidos, essa vacina ofereceu níveis protetores de até 80%, reduzindo significativamente a incidência de diarreia por rotavírus (Bernstein, *et al.*, 1995). Em países, como o Peru e Brasil, a eficácia se revelou apenas parcial, com indicadores de proteção variando de 24 a 35% (Linhares *et al.*, 1999). Em julho de 1999, o centro de Controle de Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC, Atlanta), recomendou o

adiamento das vacinações após o surgimento de casos de intussuscepção intestinal (Obstrução intestinal produzida pela invaginação de um segmento intestinal em outro) entre lactentes que receberam a vacina. (Velazquez *et al.*, 2000; Bass *et al.*, 2004).

Atualmente está no mercado brasileiro a vacina denominada de Vacina Oral de Rotavírus Humano (VORH) produzida pelo laboratório *Glaxo Smithkline Biologicals*. No esquema de duas doses, aos 2 e 4 meses de idade, esta vacina foi licenciada com o nome comercial de Rotarix™. É uma vacina elaborada com vírus isolados de humanos e atenuada para manter a capacidade imunogênica. A vacina é monovalente, ou seja, a cepa utilizada possui apenas um sorotipo em sua composição que é o G1[P8] da cepa RIX4414. Essa vacina foi bem tolerada tanto imunogenicamente como altamente eficaz durante duas estações epidemiológicas na Finlândia (Vesikari *et al.*, 2004).

A eficácia desta foi avaliada em três estudos: na Finlândia (Vesikari *et al.*, 2004); nos países: México, Venezuela e Brasil (Salinas *et al.*, 2005) e um terceiro que envolveu dez países da América Latina (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006). Considerando duas doses da vacina RIX4414, sua eficácia para prevenir episódios de diarreia grave causada por rotavírus variou de 68,5 e 90,0%. Para diarreia de qualquer gravidade, a eficácia variou entre 55,7 e 73,0% e contra a hospitalização devido à infecção por rotavírus a eficácia de proteção apresentou taxas entre 65,4 e 93,0%. A eficácia na redução de hospitalização de uma forma geral foi de 42% (Ruiz-Palacios *et al.*, 2006). De particular importância a vacina monovalente RIX4414 pode oferecer proteção cruzada em locais onde existem múltiplas amostras de rotavirus circulantes (Linhares *et al.*, 2006).

1.2.6 Diagnóstico Laboratorial

A confiabilidade e a precisão dos dados de vigilância epidemiológica de rotavírus dependem do uso de métodos adequados no diagnóstico laboratorial. Uma rápida definição etiológica do quadro diarréico pode refletir em uma conduta terapêutica apropriada pelo fato das manifestações clínicas serem semelhantes às de outros enteropatógenos, como bactérias, minimizando assim o uso desnecessário de antibióticos (Kapikian *et al.*, 2001).

Os rotavírus são excretados em altíssimas concentrações durante a fase aguda da doença, por isso, é necessário que a coleta do espécime fecal ocorra nos primeiros 2 a 5 dias

do início dos sintomas, facilitando sobremaneira sua detecção. Um dos métodos mais utilizado é o ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), visando a utilização de anticorpos monoclonais ou policlonais para a detecção da proteína VP6, constituinte básico do capsídeo intermediário comum a inúmeras amostras virais do rotavírus do grupo A (flewett *et al.*, 1989).

No teste da APL (aglutinação com partículas de látex), o sistema envolve basicamente, suspensão contendo microesferas de látex devidamente sensibilizadas com anticorpos monoclonais para a proteína VP6. Ao contato com preparações fecais positivas para rotavírus, há aglutinação nitidamente visível das partículas, se examinadas contra superfície escura (Pai *et al.* 1985, Brandt *et al.* 1987). Esse método revela sensibilidade comparável ao ELISA, com a vantagem da execução em um intervalo de tempo exíguo.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) tornou-se uma importante técnica laboratorial e epidemiológica para a caracterização de amostras de rotavírus. A PAGE é uma técnica que apresenta sensibilidade da ordem de 97,14%, quando comparada com o ensaio imunoenzimático e a imunomicroscopia eletrônica, tendo ainda a vantagem de detectar amostras que, não possuindo antígenos comuns do grupo A (Pereira *et al.*, 1983).

Outras técnicas de diagnóstico laboratorial dos rotavírus foram desenvolvidas como: hibridização a partir de sondas moleculares e reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa (RT-PCR) (Kapikian *et al.*, 2001). Esse último método, com aplicação restrita primariamente à pesquisa científica. A técnica de PCR faz o uso de *primers* específicos, os quais permitem a amplificação, “*in vitro*”, de uma determinada região do genoma viral. Essa técnica tem sua aplicação na genotipagem dos rotavírus, bem como, gera importantes informações sobre a epidemiologia molecular desse vírus, uma vez, que os classifica em múltiplos genótipos com base na especificidade inerente às proteínas VP4 e VP7 (Alfieri *et al.*, 1996; Leite *et al.*, 1996; Timenetsky *et al.*, 1997; Mascarenhas *et al.*, 1998).

1.3. JUSTIFICATIVA

A identificação dos genótipos de rotavírus do grupo A circulantes na população, pode representar reflexos diretos em Saúde Pública, uma vez que a epidemiologia destas infecções somente tem sido mais compreendida após a utilização de metodologias que permitem a caracterização molecular das amostras circulantes nos diversos tipos de populações.

Diferentemente de outras infecções entéricas e, em especial às bacterianas e parasitárias, apenas adoção de medidas de caráter higiênico não são capazes de diminuir drasticamente o número de casos clínicos das infecções por rotavírus. Algumas características peculiares dos rotavírus, tais como: sua resistência às condições ambientais e aos produtos químicos utilizados nos processos de desinfecção; alta concentração de partículas virais excretadas no período agudo da doença; presença de infecções subclínicas e de adultos portadores assintomáticos; grande variedade de hospedeiros; possibilidades de transmissão interespecies (infecções heterológicas) e caráter endêmico da infecção fazem com que as infecções por RV se manifestem de maneiras diferentes de outras doenças entéricas determinando um grande impacto na Saúde Pública, mesmo nos países desenvolvidos.

Assim, é evidente a importância e complexidade das relações antigênicas, genotípicas e epidemiológicas das infecções por RV do grupo A. Neste intuito, a genotipagem através da RT-PCR constitui uma ferramenta indispensável na caracterização molecular dos rotavírus circulantes nas populações alvos. Permitindo que um elevado número de infecções possa ser caracterizado, colaborando para que os trabalhos de vigilância epidemiológica, relativos às diferenças regionais e variações que ocorrem nas populações como genótipo mais frequente em determinado, Estado ou região sejam evidenciados, servindo de base para o uso de estratégias adequadas de prevenção.

Em Rondônia, até recentemente não havia dados sobre a etiologia dos enteropatógenos envolvidos nos processos diarreicos.

Num estudo preliminar de identificação de enteropatógenos realizado por Orlandi *et al.*, (2001), os rotavírus apresentaram uma prevalência de 25%. Assim a caracterização molecular do rotavírus através da RT-PCR, na região de Porto Velho, pode contribuir para um melhor entendimento dos sorotipos circulantes em nosso meio.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Tipar molecularmente rotavírus do grupo A, presentes em amostras fecais, associadas à gastroenterite em crianças na região de Porto Velho, Rondônia.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar os eletroforetipos de rotavírus envolvidos no grupo em estudo pela Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE);

Caracterizar os genótipos de rotavírus através da RT-PCR e Nested-PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase);

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Amostras fecais

Para este estudo foram selecionadas 79 amostras fecais denominadas “amostras casos” de crianças de 0-6 anos de idade, coletadas no período compreendido entre julho de 2000 a março de 2002, em duas unidades de saúde: Hospital Infantil Cosme e Damião, localizado na região central e Policlínica Municipal Dr. Hamilton Gondin na região periférica da cidade Porto Velho-RO. Estas amostras foram previamente identificadas como positivas para rotavírus do grupo A, através do teste de aglutinação em partículas do látex e pelo ensaio imunoenzimático para detecção de antígeno de rotavírus e adenovírus (EIARA).

3.1.2 Comitê de ética

Este trabalho foi submetido ao comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do CEPEM (Centro de Pesquisa em Medicina Tropical) de Porto Velho-RO, tendo sido aprovado pelo parecer de número 463/2003.

3.2. Métodos

3.2.1. Suspensão Fecal

As suspensões foram preparadas pela diluição do material fecal a 10% em tampão Tris-C⁺⁺ 0,01M, pH 7.2, homogeneizadas e clarificadas a 2000g por 15 minuto a 4°C. Os sobrenadantes permaneceram estocados a -20°C.

3.2.2. Extração do RNA viral

Para a extração do RNA dos sobrenadantes, duas técnicas foram utilizadas: extração de RNA pelo método da sílica, descrito por Boom *et al.*, (1990) e extração por TRIzol (GIBCO[®] BRL) descrita por (Chomczynski *et al.*, 1987).

3.2.3. Extração de RNA pelo método da sílica

O método de extração pela sílica (Boom *et al.*, 1990) se baseia nas propriedades de lise e de nuclease-inativante do agente caotrópico isotiocianato de guanidina, juntamente com a propriedade ácido nucléico ligante da partícula de sílica.

O RNA foi extraído a partir de 400 µl de suspensão fecal, previamente preparada com Tris-Ca⁺⁺ a 0,01M e pH 7,2, seguida da adição de 1000 µl de tampão L6. “Homogeneizou-se em vortex por 15” e incubou o homogeneizado por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 10 µl de sílica, homogeneizou em vortex por 15”, seguida de agitação lenta por 20 minutos à temperatura ambiente em agitador orbital. Centrifugou-se a 12.000 rpm/30 segundos e os sobrenadantes descartados. Na seqüência, adicionou-se 1000 µl de tampão L2, homogeneizou-se em vortex por 15 segundos e centrifugou-se a 12.000 rpm/30 segundos e os sobrenadantes descartados. Na etapa seguinte, adicionou-se etanol gelado a 70%, seguida de homogeneização em vortex por 15 segundos e centrifugação a 12.000 rpm/30 segundos, sobrenadantes descartados. Posteriormente, adicionou-se 1000µl de acetona PA, gelada seguida de homogeneização em vortex por 15” e centrifugação a 12.000 rpm/30 segundos, sobrenadantes descartados. Para a secagem completa dos sedimentos foi feita uma incubação em banho-maria a 56°C por 15 minutos, tubos com as tampas abertas. Posteriormente, foram acrescentados 60 µl de tampão TE 1X, homogeneizou-se em vortex e incubou por mais 15 minutos em banho-maria a 56°C, tubos com as tampas fechadas. Em seguida as amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 12.000 rpm/30 segundos e coletadas 20 µl dos eluatos para o cDNA e o restante para a PAGE, seguida conservados a - 20°C.

3.2.4. Extração do RNA pelo método TRIzol LS

Trata-se de método baseado na utilização de solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Para este método, adaptou-se o protocolo original descrito por Chomczynski *et al.*, (1987) da seguinte forma: homogenizou-se 300 µl da suspensão fecal com 750 µl do reagente TRIzol[®], agitou-se a mistura em vortex. e incubou-se o homogeneizado por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 200 µl de clorofórmio agitando a mistura em vortex com centrifugação a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Imediatamente transferiu-se o sobrenadante para um novo eppendorfe.

Precipitou-se o RNA com 500 µl de isopropanol e 30 µl da solução acetato de sódio a 0,3M em pH 5,0, centrifugou-se a 12.000 rpm/10 minutos a 14°C. Desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µl de etanol a 75% gelado ao precipitado, centrifugou-se por mais 12.000 rpm/ 10 minutos a 14°C e removeu o excesso de etanol invertendo o tubo sobre o papel absorvente e posteriormente secou o restante em um concentrador a vácuo. O RNA foi suspenso em 30 µl de água Milli-Q autoclavada e estocado a – 20°C.

3.2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

A PAGE foi realizada para determinação dos eletroferótipos de rotavírus, segundo o procedimento descrito por Pereira *et al.*, (1983). O dsRNA extraído foi submetido a uma eletroforese vertical em gel de poliacrimida composto por um gel concentrador (4%) e um separador (7.5%), tampão Tris/glicina (Tris a 0,025M/glicina a 0,109M com pH 8,2), e uma corrente de 20 mA/placa, durante 4 a 5 horas. Após a corrida, o gel foi corado pelo método de impregnação pela prata, de acordo com a descrição de Herring *et al.* (1982).

3.2.6. Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa RT-PCR, para os genótipos G e P de rotavírus

Esta técnica foi desenvolvida conforme descrito por Gouvêa *et al.*, (1990) e Gentsch *et al.*, (1992) com modificações introduzidas por Leite *et al.*, (1996), sendo realizadas em duas etapas.

A primeira etapa, após a extração do RNA realizou-se a transcrição reversa para confecção da fita de cDNA, utilizando para cada reação 1µl da mistura de iniciadores consensuais 9con1/9con2 (G) ou 4con2/4con3 (P) Figura 6 e7 e Tabela 1, que amplifica um fragmento de 904 pb para o genótipo G ou 876 pb para o genótipo P dos genes VP7 ou VP4 respectivamente. Adicionou-se 1µl de dNTPs a 2,5 mM e posteriormente 5µl do dsRNA. A seguir, esta mistura foi desnaturada a 95°C por 5 minutos e rapidamente transferida para banho de gelo por 3 minutos. Após este intervalo foram acrescentados 4 µl do tampão 5X (Tris – HCL a 20 mM com pH 7,5), 1µl do DTT a 0.1M, 1µl de inibidor de RNase OUTTM Ribonuclease (40U/µl) e 1µl da SuperScriptTM (200U/µl) e completou-se o volume final para

20µl com água ultra pura autoclavada. A síntese de cDNA foi realizada em termociclador e consistiu de um ciclo de 25°C por 5 minutos, 37°C por 1 hora e 85°C por 5 minutos.

Para a PCR misturou-se em cada reação 5,0 µl do cDNA, com 1µl de Taq DNA polimerase (5U/µl), 5µL do tampão PCR 10X((Tris-HCl 200 mM, KCL 500 mM), 1,5 µl de MgCl₂ a 50 mM, 1µl dNTP a 2,5 mM e 1µl dos primers 9con1 e 9con2 e completou-se o volume final para 50µl com água Milli-Q autoclavada. A amplificação ocorreu em termociclador e consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos. Posteriormente 40 ciclos térmicos de 94°C por 1 minuto para desnaturação; 45°C por 45 seg. para o anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão, seguidos de um ciclo final de extensão a 72°C por 10 minutos e conservação a 4°C. Os produtos da RT-PCR foram submetidos a uma eletroforese (100V/30min.) em gel de agarose 1% em tampão tris-borato EDTA (TBE) 0,5X. O gel foi corado em solução de brometo de etídio a 1µl/ml, os produtos amplificados foram observados através de transiluminador com luz ultravioleta. Determinou-se o tamanho dos amplicons através da comparação da coluna de migração com as bandas do marcador de peso molecular de 100pb.

3.2.7. Nested-PCR para os genótipos G e P de rotavírus

Após a obtenção dos produtos consensuais da RT-PCR, foi realizada a segunda etapa em Nested-PCR para a caracterização molecular dos sorotipos de rotavírus. Para cada reação foram adicionados 5 µl do cDNA consensual, 5 µl do tampão PCR 10X, 1µl dNTPs a 2,5 mM, 1,5 µl de MgCl₂ a 50mM, 1µl da Taq-DNA polimerase, 1µl/ reação do iniciador 9con1 e 1µl/ dos iniciadores específicos para a identificação dos genótipos G1, G2, G3, G4, G5, G8, G9 e G10. A amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos. Seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação inicial; 42°C por 45 seg. para o anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão, seguidos de um ciclo final de extensão a 72°C por 10 minutos e conservação a 4°C, sendo somente modificadas as temperaturas de anelamento de 42°C para os iniciadores de G1 a G5 e 55°C para os de G8 e G10. Os primers genótipo-específicos utilizados para a genotipagem do gene G foram o *pool* 9T-1 (G1), 9T1-2 (G2), 9T-3P (G3), 9T-4 (G4) e FT5 (G5); *pool* de HT8 (G8), 9T-9B (G9)

e (G10). A sequência dos primers consensuais e específicos e região de anelamento são mostrados na Figura 6 e Tabela 1, respectivamente.

Após os ciclos térmicos, submeteu-se 7µl dos amplicons a corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE pH 8,4 (Tris-borato a 89 mM, EDTA a 2 mM) contendo 0,5g/ml de brometo de etídio, em voltagem de 100V/30min. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com máquina Polaroid.

A RT-PCR para os genótipos P de rotavírus foi realizada conforme descrita para os genótipos G, utilizando-se os iniciadores consensuais 4con3/4con2, para um fragmento de tamanho de 876 pb, seguida de Nested-PCR, com o iniciador consensual 4con3 e os iniciadores específicos para os genótipos P[4], P[6], P[8] e P[9]. Os primers genótipo-específicos empregados para a determinação dos genótipos P foram o pool 2T-1 (P[4]), 3T-1 (P[6]), 1T-1 (P[8]), e 4T-1(P[9]). A sequência dos primers iniciadores e específicos para o genótipo P dos rotavírus podem ser observados na Figura 7 e Tabela 1.

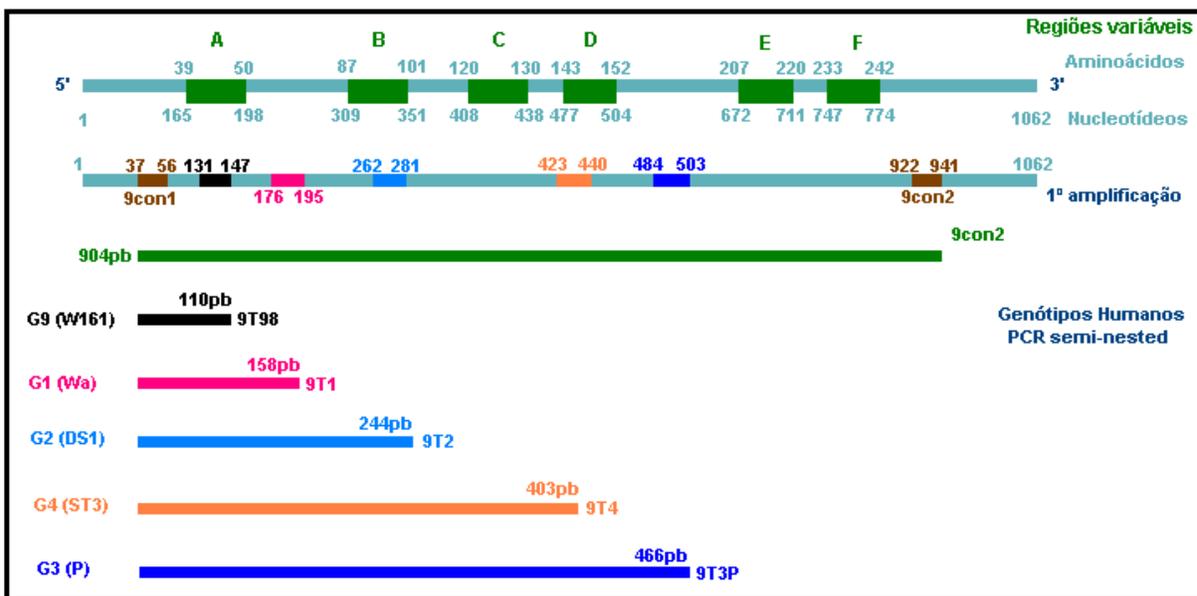


Figura 6. Esquema do gene 9 do rotavírus, o qual codifica a glicoproteína VP7, demonstrando as localizações das regiões variáveis e os comprimentos dos segmentos amplificados (adaptado de Gouvêa *et al.*, 1990; Gentsch *et al.*, 1992).

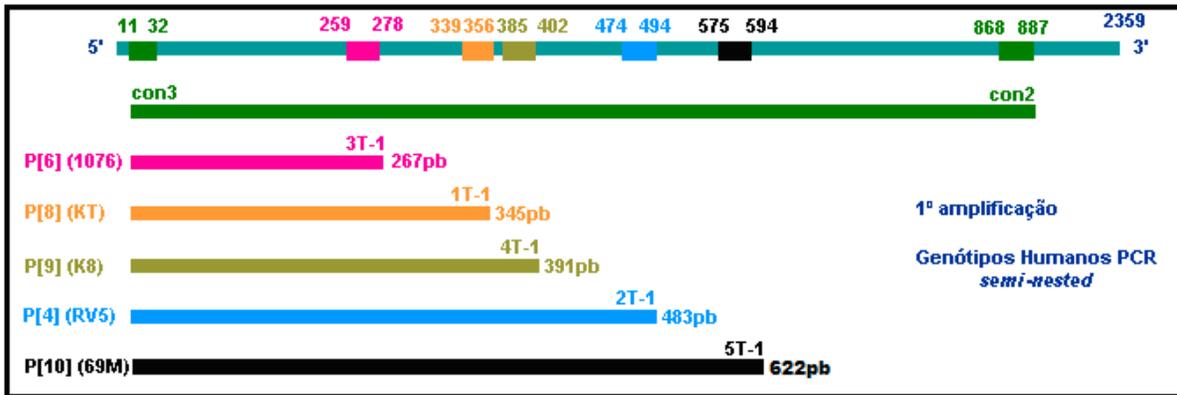


Figura 7. Esquema do gene 4 do rotavírus, o qual codifica a protease VP4, demonstrando a posição dos primers consensuais e específicos (Adaptado de Gouvêa *et al.*, 1990; Gentsch *et al.*, 1992).

Tabela 1. Sequência de primers iniciadores e específicos utilizados na RT-PCR e Nested-PCR para detecção dos genótipos G e P de rotavírus

Genótipos (gene VP7)	Iniciadores	*Sequência 5' – 3'	Nucleotídeo Posição	Fragmento amplificado (pb)
G	9 con1 (+)	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG	37 –56	-
G	9 con2 (-)	GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA	922 –941	904
G1	9T1 –1 (G1)	TCT TGT CAA AGC AAA TAA TG	176 –195	158
G2	9T1 – 2(G2)	GTT AGA AAT GAT TCT CCA CT	262 – 281	244
G3	9T-3P(G3)	GTC CAG TTG CAG TGT TAG C	484 – 503	466
G4	9T-4 (G4)	GGG TCG ATG GAA AAT TCT	423 – 440	403
G9	9T-9B (G9)	TAT AAA GTC CAT TGC AC	131 – 147	110
G5	FT5 (G5)	CAT GTA CTC GTT GTT ACG TC	760 – 779	742
G8	HT8 (G8)	CGG TTC CGG ATT AGA CAC	273 – 256	274
G10	ET10 (G10)	TTC AGC CGT TGC GAC TTC	714 – 697	715
Gene VP4				
P	4com2	ATT TCG GAC CAT TTA CC	887-868	876
P	4Con3	TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A	11-32	
P[4]	2T-1	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	494-474	483
P[6]	3T-1	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	278-259	267
P[8]	1T-1	TCT ACT TGG ATA ACG TGC	356-339	345
P[9]	4T-1	TGA GAC ATG CAA TTG GAC	402-385	391
P[10]	5T-1	CGA ACG CGG GGG TGG TAG TTG	269-289	622

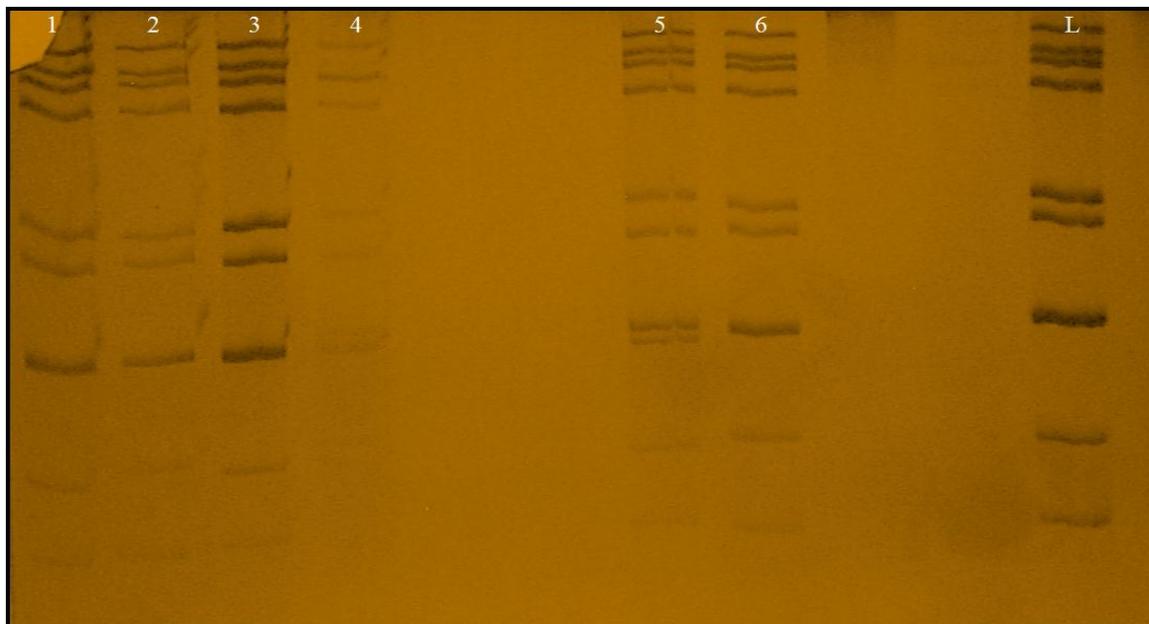
*Gouvêa *et al.*, 1990; Gentsch *at al.*, 1992.

4. RESULTADOS

4.1 Detecção de rotavírus pela eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e determinação dos eletroferotipos.

Das 79 amostras previamente identificadas para o rotavírus do grupo A, 29 (36%) apresentaram-se negativas para a PAGE e 18 (23%) não puderam ser processadas por quantidade insuficiente de material, restando 32 (40%) amostras que foram selecionadas para os trabalhos de genotipagem. Das 32 amostras fecais foi possível definir o perfil eletroferótipo pela PAGE em 26 (81%) das amostras. O eletroferótipo prevalente foi o perfil longo, correspondente a 25 (78,1%) das amostras, enquanto o perfil curto foi observado em (3,1%) das amostras Figura 8.

Figura 8. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) de dsRNA de rotavírus mostrando os perfis eletroferotipos longos.



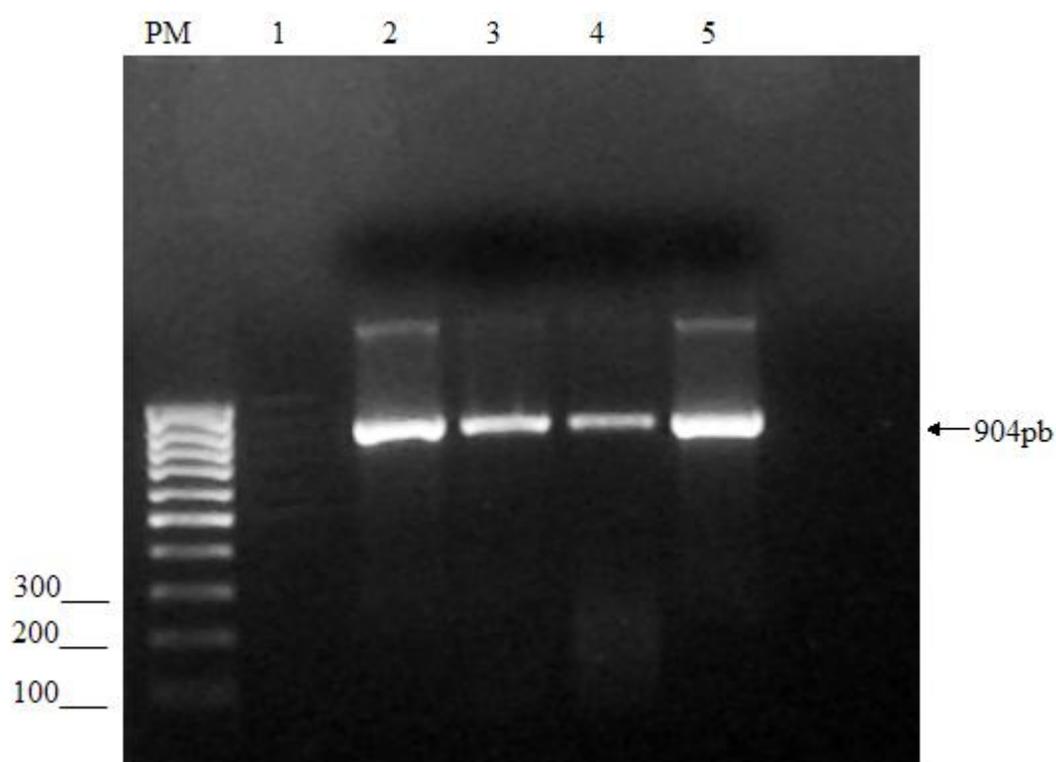
Linhas: 1-6 apresentando amostras pertencentes ao perfil longo; L – controle de padrão longo.

4.2. RT-PCR e Nested-PCR para os genótipos G e P de rotavírus

Das 32 amostras testadas pela RT-PCR foi possível a caracterização dos genótipos G em 29 (90,6%) e das mesmas 32, foi caracterizado 4 para o genótipo P.

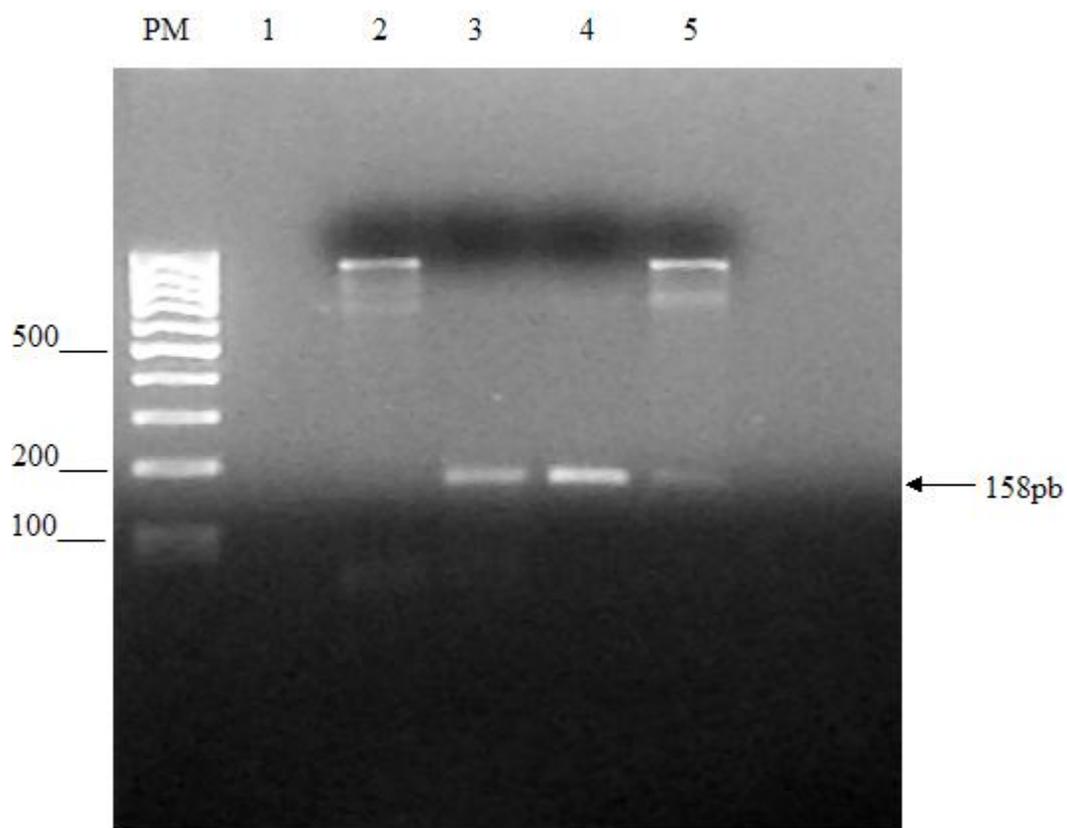
Entre as 29 amostras caracterizadas para o tipo G, 14 (48,2%) eram G1; 5 (17,2%) G2; 6 (20,6%) G3 e 4 (14%) G4. Os produtos de RT-PCR característicos de amplificação de genótipos G podem ser observados na Figura 9 e o produto da Nested – PCR nas Figuras 9a a 9d respectivamente.

Figura 9. RT-PCR para determinar genótipo G de rotavírus



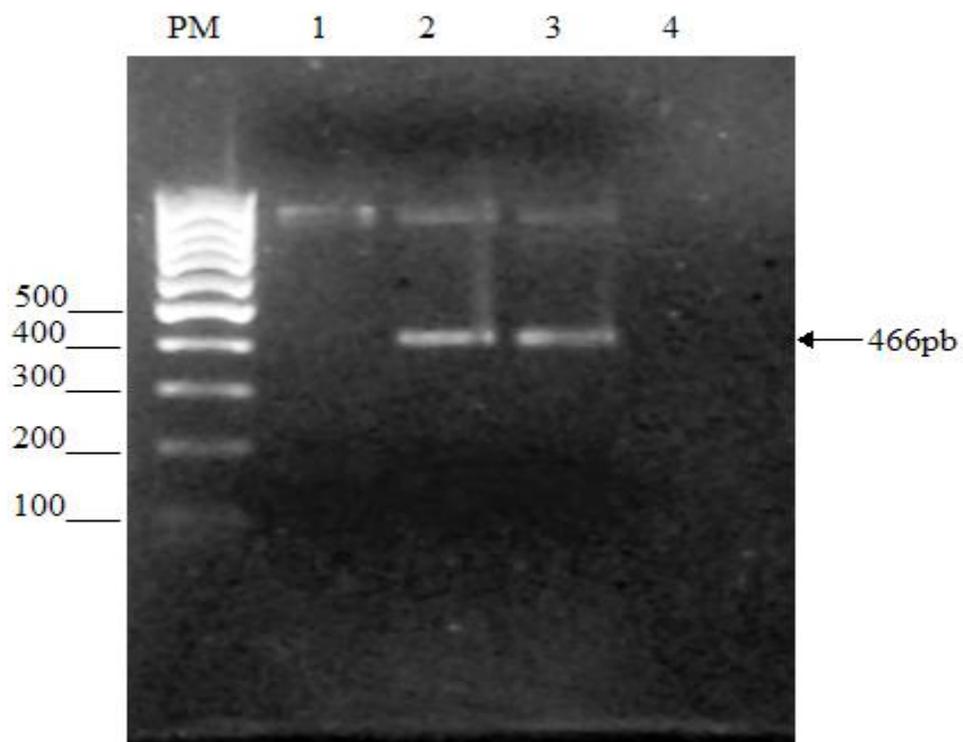
Linhas: PM – Marcador de peso molecular de 100pb 1 - controle negativo 2 a 5 – produto de RT-PCR da primeira amplificação (fragmento consensual 904pb) para genótipo G.

Figura 9a. Nested-PCR para determinar genótipos G de rotavírus



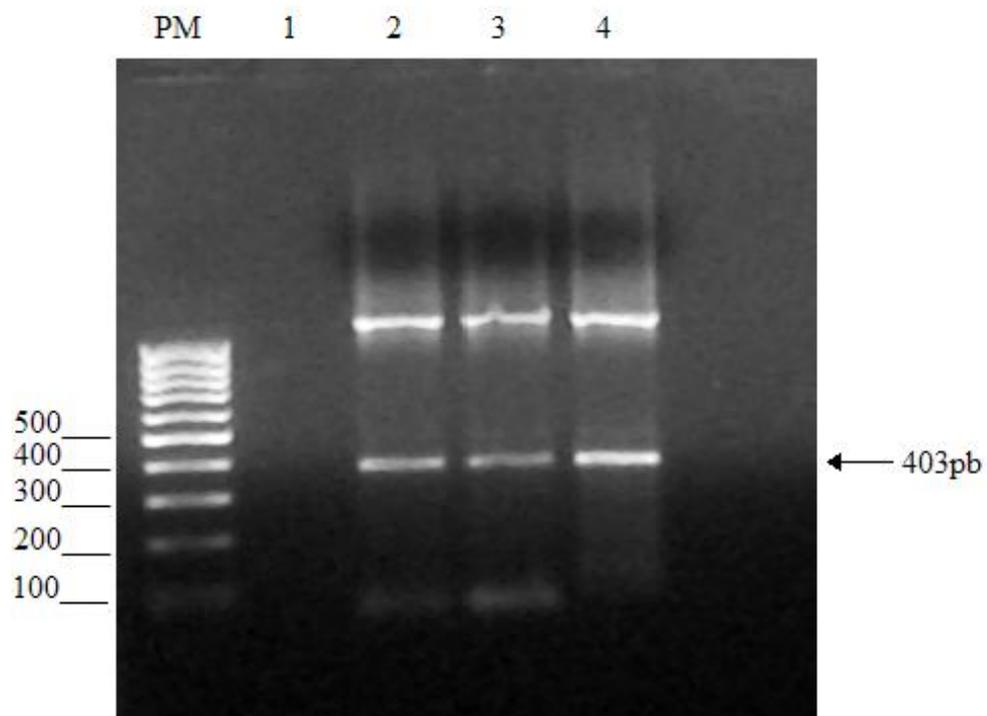
Linhas: PM – Marcador de peso molecular de 100pb 1 – controle negativo da Nested-PCR; 3 e 4 - genótipo G1 (158pb).

Figura 9b. Nested-PCR para determinar genótipos G de rotavírus



Linhas: PM – Marcador de peso molecular de 100pb 3 e 4 - genótipo G3 (466pb); - 4 controle negativo.

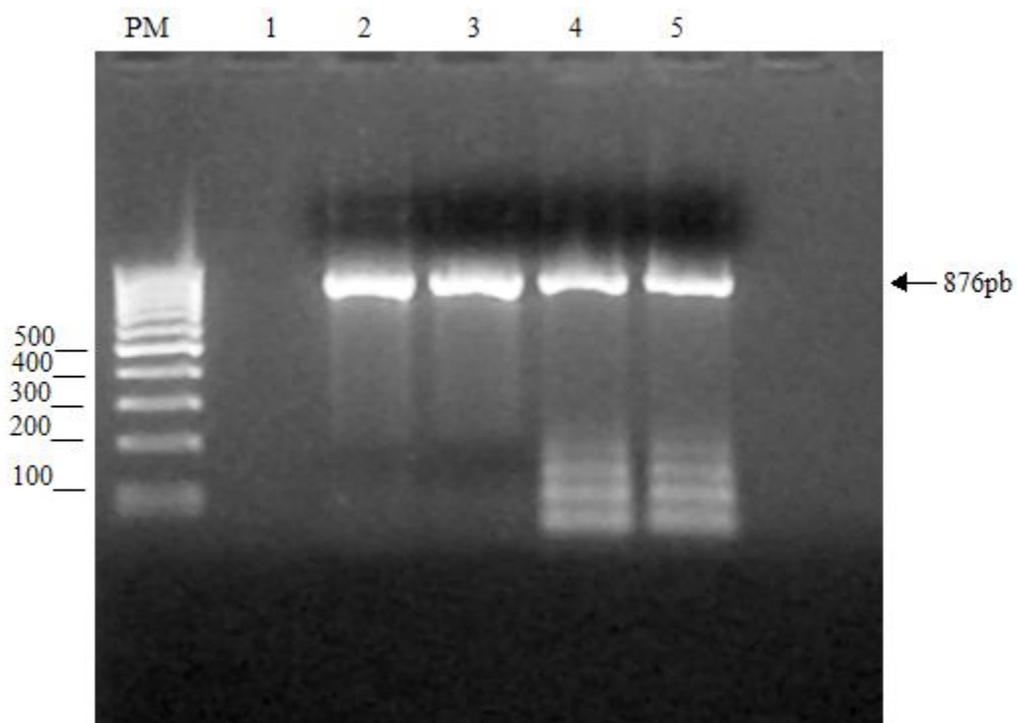
Figura 9c. Nested-PCR para determinar o genótipo G de rotavírus



Linhas: PM – Marcador de peso molecular de 100pb 1 – controle negativo da Nested-PCR;
2 a 4 genótipo G4(403 pb).

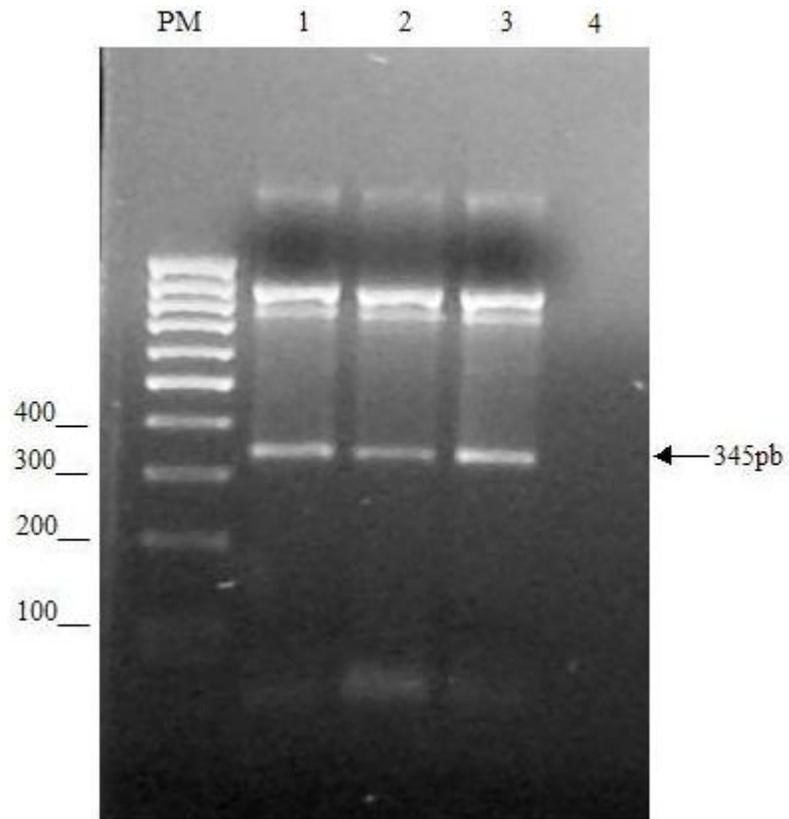
Das 32 amostras somente 4 foram tipadas para o genótipo P, sendo 3 P[8] e 1 P [4]. Os produtos de RT-PCR característicos de amplificação de genótipo P podem ser observados na Figura 10 e Nested-PCR na Figura 10a.

Figura 10. RT-PCR para determinar genótipo P de rotavírus com obtenção do fragmento consensual.



Linhas: PM – Marcador de peso molecular de 100pb 1 – controle negativo; 2-5 produto da RT-PCR da primeira amplificação.

Figura 10a. Nested-PCR para determinar genótipo P de rotavírus



Linhas: PM – Marcador de peso molecular de 100pb 1-3 genótipo P [8] e 4 controle negativo.

5. DISCUSSÃO

As gastroenterites virais agudas representam expressiva causa de morbi-mortalidade em escala universal, particularmente nos países em desenvolvimentos, onde se sobrepõe o agravante da desnutrição. De acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde) representam anualmente 1,3 bilhões de casos, 18 milhões de hospitalizações e 1,4 milhões de óbitos nos primeiros dois anos de vida (Kosek *et al.*, 2003).

Além dos problemas sociais, as doenças gastrointestinais também contribuem de forma significativa, nos gastos públicos. Em muitas nações, mais de 1/3 dos leitos pediátricos são ocupados por crianças acometidas por gastroenterite aguda, sendo estas freqüentemente tratadas com fluidos intravenosos caros e drogas ineficazes (Anonymus, 2001). A economia do país também pode ser afetada devido à redução da força de trabalho de adultos acometidos pela doença, bem como pela permanência destes acompanhando os filhos com a manifestação clínica da doença.

No presente estudo foi possível analisar o padrão eletroferótipo dos RV em 26 amostras, sendo que o perfil longo, Figura 8 foi observado em (78,1%) das amostras, enquanto o perfil curto foi visualizado em apenas (3,1%) amostra e 6 (18,7%) perfis não foram determinados. De acordo com diversos estudos no Brasil e em outras partes do mundo o perfil longo é o mais prevalente, estando geralmente associado com os genótipos G1, G3 e G4, todos relacionados com P[8] (Araújo *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2003; Luz *et al.*, 2005); ao contrário do perfil de padrão curto que possui correlação freqüente com genótipo G2 este, associado com P[4], embora essas correlações não sejam absolutas entre determinado sorotipo e os padrões eletroforéticos apresentados.

A ocorrência de (18,7%) amostras positivas para RV que produziram perfis não nítidos, sugere-se que seja devido à baixa concentração de RNA na amostra.

Neste estudo os quatros genótipos G epidemiologicamente importantes foram identificados na presente investigação Figuras 9a a 9c.

Embora os sorotipos G1-G4 sejam predominantes globalmente, se observa uma ampla variação em sua incidência de país para país e de região para região. De acordo com Pérez-Vargas *et al.*, (2006) diversos genótipos P e G, podem co-circular dentro de uma mesma região e que o genótipo prevalente em uma determinada região pode mudar anualmente e/ou

os genótipos prevalentes em diferentes regiões de um país podem ser distintos durante o mesmo período epidêmico. O sorotipo G1 predomina, na maioria das vezes, sobre os demais e acredita-se que sua permanência nos locais por tempo prolongados seja devido à elevada variabilidade de seus subtipos antigênicos, os quais podem “escapar” naturalmente da imunidade adquirida (Matson *et al.*, 1990; Bishop *et al.*, 1991).

Em estudo realizado no Japão por Koshimura *et al.*, (2000) registraram um percentual de 77% para G1, contra 14% G2, 2,7% G3, e 5,3% G4. Na Espanha Wilhelmi *et al.*, (1999) detectou G1 em 76% dos casos, contra 32% de G4, e 2% de G3. No Brasil, conforme Mascarenhas *et al.*, (2002) na cidade de Belém, os rotavírus sorotipo G1 foram identificados em 66% das amostras, contra 28% de G2 e 1% G4. Tais percentuais mostram-se próximos quando comparados com a presente investigação, onde: G1 (48,2%), G2 (17,2%), G3 (20,6%) e G4 (13,7%). De acordo com nossos resultados podemos apenas afirmar que tais sorotipos no período de 2000 a 2002 foram circulantes na nossa região.

Neste estudo o sorotipo G2 foi o segundo mais prevalente, encontrado em 17,2% das amostras Figura 9b. A predominância do sorotipo G2 sugere o maior potencial enteropatogênico desse sorotipo em relação aos demais, refletido nas hospitalizações. Em estudo no Brasil, conduzidos por Gusmão *et al.*, (1995); Cardoso *et al.*, (2000) e Araújo *et al.*, (2002) encontraram prevalência de 80%, 37% e 34% respectivamente desse sorotipo em crianças hospitalizadas.

Com relação ao genótipo G4, observa-se ampla distribuição do mesmo em outros países. Um estudo de caracterização dos RV na Itália por Arista *et al.*, (1997), exibiu um percentual de 52% relativo ao genótipo G4 em crianças hospitalizadas. Outro trabalho realizado na França por Gault *et al.*, (1999), G4 apresentou-se como predominante em 60% dos casos. Embora, com algumas exceções vários estudos evidenciam a baixa incidência dos genótipos G3 e G4 em relação ao G1 e G2. Na presente investigação ambos os sorotipos apresentaram prevalências, mas com frequências diferentes (20,6% e 13,7%) respectivamente, quando comparados com estudos realizados por Linhares *et al.*, (1988), na cidade de Belém, com amostras coletadas entre 1982 a 1986. Os sorotipos G3 e G4 foram encontrados em (3% e 17%) das amostras respectivamente, Cardoso *et al.*, (2000), durante pesquisa realizada na cidade de Goiânia com amostras de 1987 a 1994, os sorotipos G3 e G4

foram identificados em (16% e 2%) das amostras, Araújo *et al.*, (2002) na cidade do Rio de Janeiro com amostras coletadas entre 1996 a 1998, G3 e G4 foram encontrados em (13% e 5%) das amostras.

A ocorrência de infecção mista foi observada no presente estudo em apenas (3,4%) das amostras e com os sorotipos G1 + G9. Esse baixo índice diverge das elevadas taxas encontradas em estudos conduzidos no em outras partes do Brasil por Leite *et al.*, (1996); Araújo *et al.*, (2002), Santos *et al.*, (2005). Em geral, as infecções mistas podem ser consideradas o resultado de dois eventos independentes de infecção, ocorrendo simultaneamente ou sequencialmente em um único hospedeiro, evidenciando o potencial de reestruturação entre os diferentes RV, tendo como consequência o aumento da diversidade genética entre as amostra de RV.

Com relação ao sorotipo P, na presente pesquisa apenas 4 amostra das 32 amostras selecionadas foram caracterizadas para o sorotipo P Figura 10. Dessa forma, 28 amostras não foram tipadas. Com isso, a combinação binária entre sorotipo G e P foi realizada com 4 amostras caracterizadas para ambos sorotipos, sendo 2 P[8] G1 , 1 P [8] G4 e uma P[4] G2.

Para este estudo, deve-se considerar que alguns fatores podem ter contribuído para a não caracterização das 36% amostras, através da RT-PCR, como: i) repetidos congelamentos e descongelamentos a que foram submetidas essas amostras; ii) acondicionamento dos espécimes fecais a -20 e não a -70°C iii) presença de partículas defectivas; iv) baixa concentração viral no espécime fecal e v) eventual persistência de inibidores de RT-PCR.

O presente estudo mostrou que o uso da RT-PCR para a detecção de RV representa um ensaio sensível e específico. Embora, o principal entrave reside no seu alto custo e nos problemas de contaminação. Durante os procedimentos, todas as medidas preventivas de contaminação foram tomadas, com inclusão de controles negativos durante a extração do genoma viral, assim como durante a execução dos testes. A RT-PCR oferece a vantagem de que a seqüência gênica amplificada pode ser futuramente, estudada por seqüenciamento ou análise com enzimas de restrição, ampliando-se o conhecimento sobre a epidemiologia molecular das infecções por rotavírus.

Apesar da sensibilidade dessa técnica a ocorrência de amostras não tipadas pode ser ainda atribuída à variação nas seqüências de nucleotídeos da região de hibridização dos

iniciadores. Dessa forma, fica impossibilitada uma amplificação adequada, podendo tais amostras ser consideradas eventuais variantes genótípicas.

Com relação à vacina em vigor contra o rotavírus no Estado de Rondônia ainda é uma incógnita.

Uma das questões mais intrigantes em relação à efetividade da nova vacina, contra rotavírus está relacionado ao seu aspecto de proteção contra diferentes sorotipos. Já foram identificadas mais de 42 combinações entre as proteínas VP4 e VP7, permitindo grande variação de genótipos circulantes (Gentsch *et al.*, 2005). Entretanto acredita-se que a vacina monovalente G1P[8] pode conferir proteção contra a maioria das cepas desse grupo constituído pelos sorotipos G3 P[8], G4 P[8] e G9 P[8], que pertencem ao mesmo genogrupo da cepa RIX4414. Estas cepas apresentam características antagônicas na VP6 e VP4 já que pertencem ao subgrupo II e de acordo com Gonzales *et al.*, (2000), isto faz com que a infecção ocasionada por uma destas cepas induza proteção cruzada parcial aos outros sorotipos, resultando que infecções posteriores apresentem um quadro clínico leve ou infecção assintomática. Por outro lado, há poucas informações sobre a proteção da vacina monovalente humana contra cepas pertencentes a outros genogrupos emergentes, como G2, G5, G9, G10 e G12 todos associados aos genótipos P[6] ou P[4]. Sabe-se que o sorotipo G2 não compartilha determinantes antigênicos em VP6 com outros sorotipos, pois pertence ao subgrupo I.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6.1 Conclusões

Diante dos resultados apresentados pela presente pesquisa pode-se concluir que:

Os sorotipos G1, G2, G3 e G4 foram circulantes no período de 2000 a 2002 na região de Porto Velho;

A técnica de RT-PCR, seguida da Nested-PCR mostrou-se uma ferramenta indispensável na caracterização das amostras de rotavírus.

Este estudo reforça a necessidade, cada vez maior, da caracterização de amostras de RV, no sentido de ampliar o conhecimento dos sorotipos circulantes na população.

6.2. Perspectivas

Dar continuidade à caracterização das amostras para o sorotipo P de rotavírus, através da RT-PCR e Nested-PCR.

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a necessidade de um estudo de vigilância epidemiológica com amostras recentes para determinar os genótipos prevalentes atuais de RV no Estado de Rondônia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHO, L.S.; SIMON, I.; BOUR, J.B.; MORALES-GINESTE, L.; POTHIER, P.; GOUYON, J.B.; Epidemiologie des infections nosocomiales virales en pediatrie. **Pathol Biol.**, 48: p.885-892, 2000.

ALFIERI, A.A.; LEITE, J.P.; NAKAGOMI, O.; KAGA, E.; WOODS, P.A.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R. Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 From Brazil by probe-hybridization and sequence. **Arch Virol.**, 141(12): p.2353-2364, 1996.

ALVERVA, V.O et al. Incidência de gastroenterite infantil de etiologia viral em Juiz de Fora, Minas Gerais, no período de janeiro a dezembro de 1989. **J. Bras. Patol. Clín.**, 36, p.219-227, 2000.

ANONYMUS, WHO (World Health Organization). Medical Education Teaching Medical Students About Diarrhoeal Diseases, 2001.

ARANDA-MICHEL, J & GIANELLA, R.A. Acute diarrhea: a practical review. **American journal od Medicice.**, 106: p.670-676, 1999.

ARAUJO, I.T.; FIALHO. A.M.; DE ASSIS, R.M.; ROCHA, M.; GALVAO, M.; CRUZ, C.M.; FERREIRA, M.S.; LEITE, J.P. Rotavirus strain diversity in Rio de Janeiro, Brazil:characterization of VP4 and VP7 genotype in hospitalized children. **J Trop Pediatr.**, 48(4): p.214-218, 2002.

ARIAS, C.F.; ISA, P.; GUERRERO, A.C.; MÉNDEZ, E.; ZÁRATE,S.; LÓPEZ, T.; ESPINOSA, R.; ROMERO, P.; LÓPEZ, S. Molecular biology of Rotavirus cell entry.**Archives of Medical Research.**, 33: p.356-361, 2002.

ARISTA, S.; VIZZI, E.; FERRARO, D. et al. Distribution of VP7 serotype and VP4 genotype among rotavirus strains recovered from Italian children with diarrhea. **Arch Virol.**, 142(10): p.2065-2071, 1997.

BARNES, G.L et al. Etiology of acute gastroenteritis in hospitalized children in Melbourne, Australia, from April 1980 to March 1993. **J. clin. Microbiol.**, 36: p.133-138, 1988.

BASS, D.; CORDOBA, E.; DEKKER, C.; SCHUIND, A.; CASSADY, C. Intestinal imaging of children with acute rotavirus gastroenteritis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, 39: p.270-274, 2004.

BATES, P.R. et al. Comparative epidemiology of rotavirus, subgrupo F(types 40 and 41) adenovirus, and astrovirus gastroenteritis in children. **J. Med. Virol.**, v. 39: p.224-228, 1993.

BERN C, MARTINES J, DE ZOISA I, GLASS R.I. The magnitude of the global problem of diarrhea disease: a ten-year update. **Bull World Health Organ.**, 70(6): p.705-714, 1992.

BERN, C. & GLASS, R.I. Impact of diarrheal disease worldwide. In: KAPIKIAN, A.Z, ed. *Viral infections of the gastrointestinal tract*. 2.^a ed. New York: Marcel Dekker., p.1-26, 1994.

BERNSTEIN, D. I.; GLASS, R. I.; RODGERS, G.; DAVIDSON, B. L.; SACK, D. A. & US ROTAVIRUS VACCINE EFFICACY GROUP. Evaluation of rhesus rotavirus monovalent and tetravalent reassortant vaccines in US children. **JAMA.**, 273: p.1191-1196, 1995.

BISHOP, R.F.; DAVIDSON, G.P.; HOLMES, I.H.; RUCK, B.J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute gastroenteritis. **Lancet.**, 2: p.281-283, 1973.

BISHOP, R.F.; UNICOMB, L.E.; BARNES, G.L.; Epidemiology of rotavirus serotype in Melbourne, Australia, from 1973 to 1989. **J Clin Microbiol.**, 29(5):p.862-868, 1991.

BISHOP, R.F. Natural history of human rotavirus infection. **Arch Virol** (Suppl): p.119-28, 1996.

BLACK, R.E.; ROMANA, L.; BROWN, K.M. incidence and etiology of infantile diarrhea and major routes of transmission in Huascar Peru. **Am J Epidemiol.**, 129 p.785-99, 1989.

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M. et al., Rapid and simple method for purification of nucleic acid **J. Clin. Microbiol.** 28(3): p.495-503, 1990.

BRESEE, J.; FANG, Z-Y.; WANG, B.; NELSON, E.A.S.; TAM, J.; SOENARTO, Y.; WILOPO, S.A.; KILGORE, P.; KIM, J.S.; KANG, J.O. LAN, W.S.; GAIK, C.L.; MOE, K.; CHEN, K-T.; JIRAPHONGSA, C.; PONGUSWANNA, Y.; MAN, N.V.; TU, P.V.; LUAN, L.T.; HUMMELMAN, E.; GENTSCH, J.R.; GLASS, R.I. Asian rotavirus Surveillance Network. First report from the Asian Rotavirus Surveillance Network. **Emerg infect Dis.**, 10(6): 988-995, 2004.

BRANDT, C.D.; ARNDT, C.W.; EVANS, G.L.; KIM, H.W.; STALLINGS, E.P.; RODRIGUEZ, W.J.; PARROT, R.H.; Evaluation of latex test for rotavirus detection. **J Clin Microbiol.**, 25: p.1800-1802, 1987.

CANDEIAS, J.A.; RÁCZ, M.L.; TRABULSI, L.R.; MURAKOWSKI. Relative prevalence of rotavirus diarrhoea in children attending outpatient departments of hospital and general practitioners in São Paulo, Brazil. **Journal of Diarrhoeal Diseases Research.**, 7: p.24-27, 1989.

CARDOSO, D.D.P.; SOARES, C.M.A.; AZEVEDO, M.S.P.; LEITE, J.P.G. et al. Serotype and subgroups of rotavirus isolated from children in Central Brazil. **J Health Popul. Nutr** 18(1): p.39-43, 2000.

CARDOSO, D.D.; RACZ, M.L.; AZEVEDO, M.S.; MARTINS, R.M.; SOARES, C.M.; Genotyping of group A rotavirus samples from Brazilian children by probe hybridization. **Braz J Med Biol Res.**, 34: p.471-474, 2001.

CARDOSO, D.D.P.; SOARES, C.M.A.; SOUZA, M.B.L.D.; AZEVEDO, M.S.P.; MARTINS, R.M.B; QUEIROZ, D. A. O. et al., . Epidemiologia features of rotavirus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, 1998-2000. **Eur J clin Microbiol Infect Dis.**, 22: p.441-443, 2003.

CARMONA, R.C.; TIMENETSKY, M.C.; da Silva, F.F.; GRANATO, C.F. Characterization of rotavirus strains from hospitalized and outpatient children with acute diarrhoea in São Paulo, Brazil. **J Med Virol.**, 74: p.166-172, 2004.

CHEN, D., C. L. LUONGO, M. L. NIBERT, AND J. T. PATTON. Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase. **Virology.**, 265: p.120-130, 1990.

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Singer-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem.**, 162: p.156-159, 1987.

CIARLET, M & ESTES, M.K. Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. **J Gen Virol.**, 80: p.943-948, 1999.

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

COSTA, P.S.; CARDOSO, D.D.; GRISI, S.J.; SILVA, P.A.; FIACCADORI, F.; SOUZA, M.B. et al. Rotavirus A infection and reinfections: genotyping and vaccine implications. **J Pediatr.**, 80:119-22, 2004.

CRAWFORD, S. E., S. K. MUKHERJEE, M. K. ESTES, J. A. LAWTON, A. L. SHAW, R. F. RAMIG, AND B. V. PRASAD. Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. **J. Virol.**, 75: p.6052-6061, 2001.

CUNLIFFE, N.A.; KILGORE, P.E.; BRESEE, J.S.; STEELE, A.D.; LUO, N.; HART, C.A.; GLASS, R.I. Epidemiology of rotavirus diarrhoea in Africa: a review to assess the need for rotavirus immunization. *Bull WHO.*, 76:p.886-904, 1998.

DAS, S.; VARGHESE, V.; CHAUDHURI, S.; BARMAN, P.; MAHAPATRA, S. KOJIMA, K.; DUTTA, P. et al. Emergency of novel human group A rotavirus G12 strains in India. Sporadic., **J Clin Microbiol.**, 41: p.2760-2762, 2003.

DAVIDSON, G.P; BISHOP, R.F.; TOWNLEY, R.R. *et al.*, Importance of a new virus in acute in children. **Lancet.**, 1 (7901): p.242-246, 1975.

DESSELBERGER, U. Viral factors determining rotavirus rotavirus pathogenicity. **Arch Virol.**, Supp. 13: p.131-139, 1997.

DOWLING, W.; DENISOVA, E.; LAMONICA, R.; MACKOW, E.R. Selective membrane permeabilization by the rotavirus VP5 protein is abrogated by mutants in an internal hydrophobic domain. **J. Virol.**, 74: p.6368-6376, 2000.

ESTES, M.K. & COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiol Rev.**, 53(4): p.410-449, 1989.

ESTES, M.K.; NAKATA, S.; CALISHER C.H. (Eds), *Viral gastroenteritis*, Springer, New York. p.21-21, 1996.

ESTES, M.K. Rotavirus and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEI, P.M. (Ed) *Fields Virology.*, 4 ed Lippincott-Raven Press, Philadelphia. 2: p.1747-1786, 2001.

ESTES, M.K. The rotavirus NSP4 enterotoxin: current status and challenge. *In* DESSELBERGER U & GRAY, J. Viral gastroenteritis. Perspectives in Medical Virology, **Elsevier Science.**, Amsterdam, p.225-235, 2003.

FEACHEM RG. Interventions for the control of diarrhoeal disease among young children: promotion of personal and domestic hygiene. **Bull World Health Organ.**, 62: p.467-476, 1984.

FIORE, L.; GREENBERG, H.B.; MACKOW, E.R. The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. **Virology.**,18: p.553-563,1991.

FISCHER, & GENTSCH, J.R. Rotavirus typing methods and algorithms. **Rv Med Virol.**, 14(2): 71-82, 2004.

FLEWWTT, T.H.; BRYDEN, A.S.; DAVIES, H. Virus particles in gastroenteritis. **Lancet.**, 2: 1497, 1973.

FLEWETT, T.H & WOODE, G.N. The rotaviruses. Brief review. **Arch.Virol.**, 57(1): p.1-23, 1978.

GAULT, E.; CHIKHI-BRACHET, R.; DELON, S. et al. Distribution of human rotavirus G types circulating in Paris, France, during the 1997-1998 epidemic: high prevalence of type G4., **J Clin Microbiol.**, 37(7): p.2373-2375, 1999

GENTSCH, J.R.; GLASS, R.I.; WOODS, P.; GOUVEA, V.; GORZIGLIA, M.; FLORES, J.; DAS, B.K.; BHAN, M.K. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol.**, 30(6): p.365–1373, 1992.

GENTSCH, R.J.; WOODS, P.A.; RAMACHANDRAN, M.; DAS, B.K.; LEITE, J.P.; ALFIERI, A. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. **J Infect Dis.**, 174:(Suppl 1) p.S30-S36, 1996.

GENTSCH, J.R.; LAIRD A.R.; BIELFELT, B.; GRIFFIN, D.D.; BANYAI, K.; RAMACHANDRAN, M. et al., Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. **J Infect Dis.**, 192: p.146-159, 2005.

GLASS, R.I.; LEW, J.F.; GANGAROSA, R.E.; LEBARON, C.W. AND HO, M.S. Estimatives of morbidity rates for diarrheal diseases in American children **J Pediatr.**, 185: p.27-33, 1991.

GLASS, R.I.; BRESEE, J.S.; PARASHAR, U.D.; MILLER, M.; GENTSCH, J.R. Rotavirus vaccines at the threshold. **Nat Méd.**, 3(12): p.1324-1325, 1997.

GLASS, R.I.; BRESEE, J.S.; TURCIOS, R.; FISCHER, T.K.; PARASHAR, U.D.; STEELE, A.D. Rotavirus vaccines: targeting the developing world. **J Infect Dis.**, 192: (Suppl 1) p.160-166, 2005.

GONZALES- LOSA, M.R.; MARÍN-POLANCO, G.G.; PUERTO-SOLIS, M. Identificación de rotavirus asociados a serotipo G2 en Yucatán, México. **Revista da Sociedade de Medicina Tropical.**, 33:p.553-557, 2000.

GOUVEA, V. ; GLASS, R.I.; WOODS, P.; TANIGUCHI, K.; CLARK, H.F.; FORRESTER, B.; FANG, Z.Y. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **J Clin Microbiol.**, 28(2): p.276–282, 1990.

GOUVEA, V.; de CASTRO, L.; TIMENETSCK, M.; GREENBERG, H.; SANTOS, N. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. **J clin Microbiol.**, 32: p.1408-1409, 1994.

GRIFFIN, D.D.; NAKAGOMI, T.; HOSHINO, Y.; NAKAGOMI, O.; KIRKWOOD C.D.; PARASHAR, U.D. et al. Characterization of nontypeable rotavirus strains from the United States: identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6], G12) and rare P3[9] strains related to bovine rotaviruses. **Virology.**, 294: p.256-269, 2002.

GUERRANTI, R.I.; KIRCHOFF, L.V.; SHIELDS, D.S. Prospective studies of diarrheal illness in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies and risk factors. **J Infect Dis.**, 148 p. 986-97, 1983.

GUSMÃO, R.H.P.; MACARENHAS, J.DP.: In GABBAY, Y.B.; LINHARES, A.C. Rotaviruses as a cause of nosocomial, infantile diarrhoea in Northern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro., 90: p.743-749, 1995.

HERRING, A.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODRAS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrilamida gels. **J. clin. Microbiol.**, 16: p.473-7, 1982.

HOSHINO, Y & KAPIKIAN, A.Z. Rotavirus serotype: classification and importance in epidemiology, immunity and vaccine development. **J. Health Popul. Nutr.**, 18: p.5-14, 2000.

HUNG, T.; CHEN, G.; WANG, C.; CHOU, Z.; CHAO, T.; YE, W.; YAO, H.; MENG, K. Rotavirus-like agent in adult non-bacterial diarrhoea in China. **Lancet.**, 2:(8358) p.1078-1079, 1983.

HUNDLEY, .; McINTYRE, M.; CLARK, B.; BEARDS, G.; WOOD, D.; CHRYSTIE, I.; DESSELBERGER, U. Heterogeneity of genome rearrangements in rotavirus isolated from a chronically infected immunodeficient child. **J Virol.**, 61: p.3365-3372, 1987.

ITURRIZA-GOMARA, M.; WONG, C.; BLOME, S.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. Molecular characterization of genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **J Virol.**,76: p.6956-6601, 2002.

ITURRIZA-GOMARA, M.; ANDERTON, E.; KANG, G.; GALLIMORE, C.; PHILLIPS, W.; DESSELBERGER, U & GRAY, J. Evidence for genetic linkage between the gene segments encoding NSP4 and VP6 protein in common and reassortant human rotavirus strains . **J Clin Microbiol.**, 41: p.3566-3573, 2003

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

JIANG, B.; TSUNEMITSU, H.; DENNEHY, P.H.; OISHI, I.; BROWN, D.; SCHNAGL, R.D.; OSETO, M.; FANG, Z.Y.; AVENDANO, L.F.; SAIF, L.J.; GLASS, R.I. Sequence conservation and expression of the gene encoding the outer capsid glycoprotein among human group C rotaviruses of global distribution. **Arch Virol.**, 141: p.381-390, 1996.

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

JOLLY, C.L.; BEISNER, B.M.; HOLMES, I.H. Rotavirus infection of MA 104 cells is inhibited by ricinus lectin and separately expressed single binding domains. **Virology.**, 275: p.89-97, 2000.

KALJOT, K. T., R. D. SHAW, D. H. RUBIN, AND H. B. GREENBERG. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. **J. Virol.**, 62: p.1136-1144, 1988.

KAPIKIAN, A.Z.; KIM, H.W.; WYATT, R.G.; RODRIGUEZ, W.J.; ROSS, S.; CLINE, W.L.; et al. Reovirus-like agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. **Science.**, 185: p.1049-1053, 1974.

KAPIKIAN, A.Z. Overview of viral gastroenteritis. **Arch Virol**, suppl, 12: p.7-19, 1996.

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

KAPIKIAN, A.Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E. et al., ed. **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins., p.1787-1833, 2001.

KILGORE, P.E. & GLASS, R.I. Gastrointestinal syndromes. In: **Clinical Virology**. RICHMAN D.D.; WHITLEY, R.J.; HAYDEN, F.G. 1 ed New York: Churchill Livingstone., p.55-67, 1997.

KOSEK, M.; BERN C, GUERRANT RL. The magnitude of the global burden of diarrheal disease from studies published 1992–2000. **Bull World Health Organ**; 81 (3): p.197-204, 2003.

KOSHIMURA, Y.; NAKAGOMI, T & NAKAGOMI, O. The relative frequencies of G serotype of rotavirus recovered from hospitalized children with diarrhea: a 10-year survey (1987-1996) in Japan with a review of globally collected data. **Microbiol Immunol.**, 44 (6): p.499-510, 2000.

KUZUYU, M.; FUJII, R.; HAMANO, M.; NAKAMURA, J.; YAMADA, M.; NII, S.; MORI, T. Molecular analysis of outer capsid glycoprotein (VP7) genes from two isolates of human group C rotavirus with different genome electropherotypes. **J Clin Microbiol.**, 34: p.3185-3189, 1996.

LAWTON, J. A.; ZENG, C.Q.; MUKHERJEE, S.K.; COHEN, J.; ESTES, M.K.; PRASAD, B.V. 1997. Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer. **J Virol.**, 71: p.7353-7360, 1997.

LeBARON, C.W.; LEW, J.; GLASS, R.I.; WEBER, J.M.; RUÍZ-PALACIOS, G.M. Rotavirus study group. Annual rotavirus epidemic patterns in North America: results of five-year retrospective survey of 88 centers in Canada, Mexico and the United States. **JAMA.**, 264: p.983-988, 1990.

LEITE, J.P.G.; ALFIERI, A.A.; WOODS, P.A.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R. – Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. **Arch Virol.**, 141: p.2365-2374, 1996.

LINHARES, A.C.; PINHEIROS, F.P.; SCHMETZ, C.; MULLER, G.; PETTERS, D. Duovírus (rotavírus) em Belém do Pará. **Rev Inst Med Trop.**, 19 (4): p.278-279, 1977.

LINHARES, A.C.; LANATA, C.F.; HAUSDORFF, W.P.; GABBAY, Y.B.; BLACK, R.E. Reappraisal of the Peruvian and Brazilian lower titer tetravalent rhesus-human reassortant rotavirus vaccine efficacy trials: analysis by severity of diarrhea. **Pediatr Infect Dis J.**, 18(11): p.1001-1006, 1999.

LINHARES, A.C. & BRESEE, J.S. Rotavirus vaccine and vaccination in Latin America. **Pan Amer J publ Hlth.**, 8: p.305-331, 2000.

LINHARES, A.C.; CARMO, K.B.; OLIVEIRA, K.K.; OLIVEIRA, C.S.; FREITAS, R.B.; BELLESI, N. et al., Nutritional status in relation to efficacy of the rhesus-human reassortant,

tetravalent rotavirus vaccine (RRV-TV) in infants from Belém, Pará state, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. 44: p.13-16, 2002.

LIGHT, J.S. & HODES, H.L. Study on epidemic diarrhoea of the newborn: isolation of a filterable agent causing diarrhoea in calves. **Am J Pud Health.**, 33: p.1451-1454, 1943.

LIU, M.; MATTION, N.M.; ESTES, M.K. rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. **Virology.**, 188: p.77-84, 1992.

LOPEZ, T.; CAMACHO, M.; ZAYAS, M.; NÁJERA, R.; SÁNCHEZ, R.; ARIAS, C. F. & LÓPEZ, S. Silencing the morphogenesis of rotavirus **J Virol.**, 79: p.184–192, 2005.

LOPES, S & ARIAS, C.F. Attachment and post-attachment receptors for rotavirus. *Viral Gastroenteritis. Perspectives in Medical Virology.* **Elsevier Science**, Amsterdam., p.143-163, 2003.

LÓPEZ, S & ARIAS, C.F. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. **Trends Microbiol.** 12: p.271-278, 2004.

LUNDGREN, O.; PEREGRIN, A.T.; PERSSON, K.; KORDASTI, S.; UHNOO, I.; SVENSSON, L. Role of enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. **Science.**, 287: p.491-495, 2000.

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

LUNDGREN, O & SVENSSON, L. The enteric nervous system and infectious diarrhea. *In* DESSELBERGER, U.; GRAY, J. *Viral gastroenteritis. Perspectives in Medical Virology.* **Elsevier Science**, Amsterdam, p:51-67, 2003.

LUZ, C.R.N.; MASCARENHAS, J.D.P.; GABAY, B.Y.; MOTTA, A.R.B.; LIMA, R.V.T.; SOARES, L.S.; LINHARES, A.C. Rotavirus serotype and electroperotypes identified among

hospitalized children in São Luis, Maranhão, Brazil. **Inst Med trop S. Paulo.**, 47(5): p.287-293, 2005.

MALTHEZOU, H.C.; ZAFIROPOULOU, A.; MAVRIKOU, M.; BOZAVOUTOGLU, E.; LIAPI, G.; FOUSTOUKOU, M. AND KAFETZIS, D. A. Acute diarrheal in children treated in an outpatient setting in Athens, Greece. **J Infect.**, 43: p.122-127, 2000.

MARTELLA, V.; CIARLET, M.; BANYAI, K.; LORUSSO, E.; CAVALLI, A.; CORRENTE, M. et al. Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. **Virology.**, 346: p.301-311, 2006.

MASCARENHAS, J.D.P.; PAIVA, F.L.; BARARDI, C.R.M.; GABBAY, Y.B.; SIMÕES, C.O.; LINHARES, A.C.; Rotavirus G and P types in children from Belém, northern Brazil, as determined by RT-PCR: occurrence of mixed P type infections. **J Diarrhoeal Dis Res.**, 16: p.8-14, 1998.

MASCARENHAS, J.D.P.; GUSMÃO, R.H.P.; BARARDI, C.R.M.; PAIVA, F.L.; SIMÕES, C.O.; GABBAY, Y.B.; MONTEIRO, T.A.F.; LINHARES, A.C. Characterization of rotavirus P genotypes circulating among pediatric patients in northern Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo.** 41: p.165-170, 1999.

MASCARENHAS, J.D.P.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; LEITE, J.P.G. Detection and characterization of rotavirus G and P types from children participating in a rotavirus vaccine trial in Belém, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, 97: p.113-117, 2002.

MATSON, D.O.; ESTES, M.K.; BURNS, J.W.; GREENBERG, H.B.; TANIGUCHI, K.; URUSAWA, S. Serotype variation of human group A rotaviruses in two regions of the USA. **J Infect Dis.**, 162(3): p.605-614, 1990.

MERTENS, P. The dsRNA viruses. **Virus Res.**, 101(1):p.3-13, 2004.

MILLER, M.A. & McCANN, L. Policy analysis of the use of hepatitis B Haemophilus influenzae type B, Streptococcus pneumoniae-conjugate and rotavirus vaccine in national immunization schedules., **Hlth Econ.**, 9: p.19-35, 2000.

MOLBAK, K.; FSCHER-PERCH, T.K.; MIKKELSEN, C.S. The estimation of mortality due to rotavirus infections in sub-Saharan Africa. **Vaccine.**, 19: p.393-395, 2001.

MURPHY, T.V.; GARGIULLO, P.M.; MASSOUDI, M.S.; NELSON, D.B.; JUMAAN, A.O.; OKORO, C.A. et al. Intussusception among infants given an oral rotavirus. **Vaccine. N Engl J Med.**, 344: p.564-572, 2001.

NILSSON, M.; SVENUNGSSON, B.; HELDLUND, K.O.; UHNOO, I.; LAGERGREN, A.; AKRE, T.; SVENSSON, L. Incidence and genetic diversity do group C rotavirus among adults. **J. Infect. Dis.**, 182: p.678-684, 2000.

OFFIT, P.A. Host factors associated with protection against rotavirus disease: the skies are clearing. **Journal of Infectious Diseases.**,174: p.S59-S64, 1996.

O'RYAN, M.J.; RAMSAY, M.; BROWN, D. Hospital admissions attributable to rotavirus infection in England and Wales. **J Infect Dis.**, 174: (suppl.1) p.S12-S18, 1996.

O'RYAN, M.J.; PEREZ-SCHAEL, I.; MAMANI, N.; PENA, A.; SALINAS, B.; GONZALEZ, G.; GONZALES. F.; MATSON, D.O.; GOMEZ, J. Rotavirus associated medical visits and hospitalization in South America: a prospective study at three large sentinel hospitals. **Pediatr Infect Dis J.**, 20 (7): p.685-693. 2001.

ORLANDI, P.P.; SILVA, T.; MAGALHÃES, G.F.; ALVER, F.; CUNHA, R.P.A.; DURLACHER, R.; SILVA, L.H.P. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, 96: p.621-625, 2001.

PAI, C.H.; SHAHRABADI, M.S.; INCE, B. Rapid diagnosis of rotavirus gastroenteritis by a commercial látex agglutination test. **J Clin Microbiol.**, 22: p.846-850, 1985.

PALOMBO, E. A.; BISHOP, R.F.; COTTON, R.G.H. Intra and inter season genetic variability in the VP7 gene serotype 1 (monotype 1a) rotavirus clinical isolates. **Arch Virol.**, 130: p.57-69, 1993.

PARASHAR, U.D.; HUMMELMAN, E.G.; BRESEE, J.S.; MILLER, M.A.;GLASS, R.I. Global illness and deaths caused by rotavirus diasease in children. **Emerg Infect Dis.**, 9: p.565-572, 2003.

PATTON, J.T. & SPENCER, E. Genome replication and pachaging of segmented double stranded RNA viruses. **Virology.**, 277: p.217-225, 2000.

PEDLEY, S.; HUNDLEY, F.; CHRYSTIE, I.; McCRAE, M.A.; DESSELBERGER, U. The genome of rotavirus isolated from chronically infectedimmunodeficient children. **J Gen Virol.**, 65: p.1141-1150, 1984.

PENARANDA, M. E.; HO, M.S.; FANG, Z.Y.; DONG, H.; SHENG, .X.; YE, W.W.; ESTES, M.K.; ECHEVERRIA, P.; HUNG, T.; GLASS, R.I.Seroepidemiology of adult diarrhea rotavirus in China, 1977-1987. **J Clin Microboiol.**, 27:p.2180-2183, 1989.

PEREIRA, H.G.; AZEVEDO, R.S.; LEITE, J.P.G.Comparison of polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, (4): 483-490, 1983.

PEREIRA, H.G.; LEITE, JPG.; AZEVEDO, R.S. et al., Na atypical rotavirus detected in a child with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, 78 (3): p.245-250, 1985.

PEREIRA, H.G.; LINHARES, A.C.; CANDEIAS, J.A.N.; GLASS, R.I. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. **Bull Pan Am Health Organ.**, 27: p.224-233, 1993.

PEREZ-VARGAS, J.; ISA, P.; LOPES, S.; ARIAS, C.F. Rotavirus vaccine early introduction in Latin America-risks and benefits. **Arch Med Res.**, 37(1): p.1-10, 2006..

PONGSUWANNA, Y.; GUNTAPONG, R.; CHIWAKUL, M.; TACHAROENMUANG, R.; ONVIMALA, N; WAKUDU M, et al. Detection of a human rotavirus with G12 and P[9] specificity in Thailand. **J Clin Microbiol**; 40: p.1390-1394, 2002.

PRASAD, B. V.; BURNS, J.W.; MARIETTA, E.; ESTES, M.K.; CHIU, W. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. **Nature.**, 343: p.476-479, 1990

PRASAD, B.V.; ROTHNAGEL, R.; ZENG, C.Q.Y.; JAKANA, J.; LAWTON, J.A.; CHIU, W; ESTES, M.K. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. **Nature.**, 382: p.471-473, 1996.

PRASAD, B.V. & ESTES, M.K.; Molecular basis of rotavirus replication: structure-function correlation In CHIU, W.; BURNETT, R.; GARCIA, R. (ed), structural biology of viruses. Oxford University Press New York., p.239-268, 1997.

RÁCZ, M.L.; CANDEIAS, J.A.N.; TRABULSI, J.R.; MURAHOWSKY, J. Diarrheal diseases in Brazil: clinical features of rotavirus-associated gastroenteritis in children. **Eur J Epidemiol.**, 4(3): 382-385, 1988.

RODRIGUEZ-BAEZ, N.; O'BRIEN, R.; QIU, S.Q.; BASS, D.M.; Astrovirus, Adenovirus and Rotavirus in hospitalized children: prevalence and association with gastroenteritis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, 35(1): p.64-68, 2002.

RUGGIERE, F.M & GREENBERG, H.B. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cell in culture. **J Virol.**, 65: p.2211-2219, 1991.

RUIZ-PALACIOS, G. M.; PEREZ-SCHAEL, I.; VELAZQUEZ, F. R.; ABATE, H.; BREUER, T.; CLEMENS, S. C.; CHEUVART, B.; ESPINOZA, F. et al. The Human Rotavirus Vaccine Study Group. Safety and Efficacy of an Attenuated Vaccine against Severe Rotavirus Gastroenteritis. **N Engl J Med.**, 354: p.11-22, 2006.

SANTOS, N.; SOARES, C.C.; VOLOTÃO, E.M.; ALBUQUERQUE, M.C.M.; HOSHINO, Y. Surveillance of rotavirus strains in Rio de Janeiro, from 1997-1999. **J Clin Microbiol.**, 41(7): p.3399-3402, 2003.

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

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

SHAW, A.L.; ROTHGEL, R.; ZENG, C.Q.Y.; LAWTON, J.A.; RAMING, R.F.; ESTES, M.K.; PRASAD, V.B.V. Rotavirus structure: interactions between the structural protein. In: CHIBA, S.; ESTES, M.K.; NAKATA, S.; CALISHER C.H. (Eds), *Viral gastroenteritis*, Springer, New York, p.21-21, 1996.

SOUZA E.C.; MARTINEZ, M.B.; TADDEI, C.R.; MUKAI, L.; GILIO, A.E; RACZ, M.L. et al., Etiologia profile of acute diarrhea in children with rotavirus infection. **J Pediatr.**, 78: p.31-38, 2002.

SOUZA, M.B.; RACZ, M.L.; LEITE, J.P.; SOARES, C.M.; MARTINS, R.M. Molecular and serological characterization of group a rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Goiânia, Brazil, 1998-2000. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, 22: p.441-443, 2003.

SORIANO-GABARRÓ, M.; MRUKOWICZ, J.; VESIKARI, T.; VERSTRAETEN, T. Burden of rotavirus disease em european Union countries. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 25:p.S7-S11, 2006.

STEELE, A.D.; PEENZE, I.; de BEER, M.C.; PAGER, C.T.; YEATS, J.; POTGIETER, N.; RAMSARROP, U.; PAGE, N.A.; MITCHELLI, J.O.; GEYER, A.; BOS, P.; ALEXANDER, J.J. Anticipating rotavirus vaccine : epidemiology and surveillance of rotavirus in South Africa. **Vaccine.**, 21:p.354-360, 2003.

TANIGUCHI, K. & URASAWA S. Diversity in rotavirus genomes. **Virology.**, 6:p.123-131,1995.

TIHOVA, M., K. A. DRYDEN, A. R. BELLAMY, H. B. GREENBERG, AND M. YEAGER. Localization of membrane permeabilization and receptor binding sites on the VP4 hemagglutinin of rotavirus: implications for cell entry. **J. Mol. Biol.**, 314: p.985-992, 2001

TIMENETSHY, M.C.; GOUVEA, V.; SANTOS, N.; ALGE, M.E.; KISIELLIUS, J.J.; CARMONA, R.C.C. Outbreak of severe gastroenteritis in adults and children associated with type G2 rotavirus. Study group on diarrhea of the Instituto Adolfo Lutz. **J Diarrhoeal Dis Res.**, 14 (2):p.71-74, 1996.

TIMENETSKY, MC.S.T.; GOUVEA, V.; SANTOS, N. et al. Novel human rotavirus serotype with dual G5-G11 specificity. **J Gen Virol.**, 78:p.1373-378, 1997.

UCHIDA, R.; PANDEY, B.D.; SHERCHAND, J.B.; AHMED, K.; YOKOO, M.; NAKAGOMI, T.; CUEVAS, L.E.; CUNLIFFE, N.A.; HART, C.A.; NAGAGOMI, O.

Molecular epidemiology of rotavirus diarrhea among children and adults in Nepal: detection of G12 strains with P[6] or P [8] and a G11P [25] strain,. **J Clin Microbiol.**, 44(10): p.3499-3505, 2006.

VALENZUELA, S., J. PIZARRO, A. M. SANDINO, M. VASQUEZ, J. FERNANDEZ, O. HERNANDEZ, J. PATTON, AND E. SPENCER. Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. **J Virol.**, 65:3964-3967, 1991.

VELAZQUEZ, F.R.; MATSON, D.O; GUERRERO, M.L.; SHULTS, J.; CALVA, J.J.; MARROW, A.L. et al., Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. **J Infect Dis.**, 182: p.1602-1609, 2000.

VESIKARI, T.; KARVONEN, A.; PUUSTINEN, L.; ZENG, S.Q.; SZAKAL ED, DELEM, A. et al. Efficacy of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in Finnish infants. **Pediatr Infect Dis J.**, 23:937-943, 2004.

WARD, R.L.; BERNSTEIN, D.I. Protection against rotavirus disease after natural rotavirus infection. US Rotavirus Vaccine Efficacy Group. **J Infect Dis.**, 169: p. 900-904, 1994.

WARD, R.L. Mechanisms of protection against rotavirus in humans and mice. **J Infect Dis.**, 174: (Suppl 1): S51-58, 1996.

WICKELGREN, I. How rotavirus causes diarrhea *Science* 287(5452):409-411, 2000.

WILHELMI, I.; MIER, C.; ROMAN, E. et al. The molecular epidemiology of the rotavirus in Spanish children. The Rotavirus study group. **Enferm Infecc Microbiol Clin.**, 17(10):p.509-514, 1999.

WILHELMI, I.; ROMAN, E.; SANCHEZ-FANQUIER, A. Viruses causing gastroenteritis. **Clinical Microbiology & Infection.**, 9: p.247-262, 2003.

ZARATE, S., R. ESPINOSA, P. ROMERO, E. MENDEZ, C. F. ARIAS, AND S. LOPEZ. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells., **J Virol.**, 74:593-599, 2000.

ZHANG, M.; ZENG, C.Q.;DONG, Y.; BALL, J.M.; SAIF, L.J.; MORRIS, A.P.; ESTES. M.K. Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. **J Virol.**, 72: p.3666-3672, 1998.

ANEXOS

Anexo A: Documento de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa com seres humano do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Porto Velho-RO

Anexo B: Lista dos materiais e preparo das soluções utilizadas na pesquisa